



Identification et caractérisation des sites de transport de CadA, l'ATPase-cadmium de *Listeria Monocytogenes*.

Chen-Chou Wu

► To cite this version:

Chen-Chou Wu. Identification et caractérisation des sites de transport de CadA, l'ATPase-cadmium de *Listeria Monocytogenes*.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. <tel-00121780>

HAL Id: tel-00121780

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00121780>

Submitted on 22 Dec 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier- GRENOBLE 1

UFR de BIOLOGIE

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR ès SCIENCE DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement

Par

ChenChou WU

Le 17 Janvier 2005

Titre :

**Identification et caractérisation des sites de transport de CadA,
l'ATPase-cadmium de *Listeria monocytogenes*.**

Directeurs de thèse :

Dr. Elisabeth Mintz

Dr. Patrice Catty

Jury :

Président :

Rapporteur : Pr. André Goffeau

Rapporteur : Pr. Marc le Maire

Examineur : Pr. Claude Roby

Thèse subventionnée par la région Rhône-Alpes

Je me souviens du jour de mon arrivée à Grenoble. Florent était déjà à la gare. A cette époque, je ne pouvais pas imaginer que cet accueil allait jouer un rôle aussi important dans ma carrière. Je regardais Florent remplir mes dossiers d'inscription au DEA, s'informer, négocier un logement pour moi et se soucier de mon installation. Grâce à sa gentillesse, je n'avais pour tâche que de monter à la Bastille en prenant le téléphérique et de regarder le magnifique paysage de cette ville si nouvelle à mes yeux.

Dans sa voiture bordeaux parsemée d'outils, il m'a initié à la connaissance du cycle enzymatique de l'ATPase calcium avec un crayon en traçant le cycle sur un brouillon. A travers son explication, tout ce qui était compliqué se transformait en simples et faciles jeux d'enfants. Il m'a aussi éclairci certains points obscurs, non seulement dans les domaines de la science et de l'histoire française, mais aussi en oenologie dont j'avais tellement souffert de ses effets. (Je me demande en effet parfois si je n'ai vraiment pas d'enzyme !).

Mon aventure scientifique en France a pris son début par mes études en DEA. Même aujourd'hui, à chaque fois que je pense à cette période, un frisson incontrôlable m'envahit toujours. Comment puis-je obtenir ce diplôme avec une simple mention ? Il aurait fallu un miracle. La réponse est tout simple, j'ai eu la chance d'avoir Patrice comme directeur. J'ai obtenu mon DEA avec les yeux fermés, Patrice en faisant le reste. Sans lui, je savais pertinemment que je n'aurais pas pu aller plus loin.

Mes amis me demandent quel est le secret pour développer un pays magnifique comme la France. En regardant Patrice, je me suis aperçu que la réponse n'est pas loin. Sa générosité m'a imprégné pendant cinq ans. J'ai conscience qu'il n'y a que la générosité qui peut faire avancer l'ensemble des choses. Le reste n'est que secondaire et éphémère. Je le remercie aussi pour sa tolérance et sa patience.

Par rapport aux autres étudiants de DEA qui se battent sans merci pour obtenir une bourse de thèse, je n'ai fait que signer un document qu'Ely m'avait préparé et que je n'avais même pas lu. Quand elle m'a téléphoné pour m'annoncer la bonne nouvelle et me demander si j'étais content, je ne savais pas si j'étais sur terre ou dans le paradis. Au bout de trois ans, elle a encore une fois frappé la porte pour moi : la porte de l'Amérique.

Devant Ely et son élégance, je suis toujours obligé d'être poli et parfois, j'ai du mal à ignorer ses commentaires. Elle m'écoute toujours attentivement et me fait des conseils toujours constructifs. Devant elle, je suis comme un petit soldat prétentieux brandissant vainement son épée dans l'air. La seule issue pour moi, c'est de poser mon arme et de respirer autant que possible.

Les caractéristiques de ce labo sont son air, qui sent le parfum féminin, des rires éclatants, des blagues insolentes et des cris dynamiques. Martine, Rachel et Isa m'apprennent comment être humble devant une femme qui sait faire plus qu'un homme. Dans ce monde en progression, l'avenir leur appartiendra. Dans ce courant moderne, le seul rescapé Roger se contente de

pourvoir au besoin quotidien du labo. Roger, où se trouve ? lui ai-je demandé de nombreuses fois. Il m'a toujours fourni tout ce dont j'avais besoin.

La richesse de la langue française me sert toujours de refuge dans un moment difficile. «Quelles que soient nos infirmités personnelles, la noblesse de notre métier s'enracinera toujours dans deux engagements difficiles à maintenir, le refus de mentir sur ce que l'on sait, et la résistance à l'oppression ». *Camus et la morale*. Ma mère m'a dit que son fils pouvait parler Taiwanais comme un étranger. Si je perds ma langue maternelle petit à petit, je sais que ce n'est pas pour rien.

Je remercie encore une fois pour votre accueil et votre gentillesse. Ce passage en France est un moment crucial pour moi et je ne l'oublierai jamais.

Sommaire

Abréviations

Introduction :

I.1 CadA de *Listeria monocytogenes*

I.2 Les ATPases de type P

I.3 Caractéristiques de la séquence protéique des ATPases de type P

I.4 Classification des ATPases de type P

I.4.1 Les ATPases de type PI

I.4.2 Les ATPases de type PII

I.4.3 Les ATPases de type PIII

I.4.4 Les ATPases de type PIV

I.4.5 Les ATPases de type PV

I.5 Les transporteurs actifs

I.6 Caractéristiques enzymatiques des ATPases de type P

I.6.1 La fixation du Ca^{2+}

I.6.2 Phosphorylation de l'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a en présence de Ca^{2+}

I.6.3 Déphosphorylation de l'ATPase- Ca^{2+} phosphorylé

I.6.4 Réversibilité du cycle enzymatique de l'ATPase- Ca^{2+}

I.7 Changements de conformation des ATPases de type P

I.7.1 Etude des changements de conformation par fluorescence

I.7.2 Etude des changements de conformation par protéolyse ménagée

I.7.3 Etude des changements de conformation par structure cristalline

I.8 Cycle catalytique des ATPases de type P

I.8.1 Le modèle E1-E2 (Fig. I6)

I.8.2 Le modèle structural (Fig. I7)

I.9 Objectifs de la thèse

Matériel et méthodes :

M.1. Matériel et méthodes sur Résultat R1

M.1.1 Schéma global

M.1.2 Matériel

M.1.3 CadA_{LM} sauvage

M.1.4 Les formes de CADA étiquetées

M.1.5 Tests phénotypiques

M.1.6 L'extrait membranaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

M.1.7 Dosage des protéines

M.1.8 Gels SDS-PAGE

M.1.9 Immunodétection

M.2. Matériel et méthodes sur Résultat R2

M.2.1 Schéma global

M.2.2 Mesures de phosphorylation par l'ATP

M.2.3. Mesures de phosphorylation par le phosphate inorganique

M.2.4 Mesures d'activité ATPase

M.3. Matériel et méthodes sur Résultat R3

M.3.1 Schéma global

M.3.2 Mutagenèse dirigée par PCR

M.4. Matériel et méthodes sur Résultat R4

M.4.1 Schéma global - Voir R12 et R16

M.4.2 Grand domaine cytoplasmique de CadA_{LM}, CCC2 et Serca1a

M.4.3 Domaine nucléotidique de CadA_{LM}, CCC2 et Serca1a

M.4.4 Domaine de phosphorylation de CadA_{LM}, CCC2 et Serca1a

Résultats :

R.1 Expression de CadA_{LM} et de ses variants dans *Saccharomyces cerevisiae*

R.1.1 Augmentation de la sensibilité au cadmium de *S. cerevisiae* induite par CadA_{LM}

R.1.2 Le phénotype de la levure exprimant CadA_{LM} n'est pas reproduit par des levures exprimant d'autres ATPases de type P.

R.1.3 Effets des métaux

R.1.4 CadA_{LM} produite dans la levure est fonctionnelle

R.1.5 Localisation intracellulaire de CadA_{LM}

R.1.6 Comment CadA_{LM} empoisonne-t-elle la levure ?

R.2 Etude fonctionnelle de CadA_{LM} en absence de Mg²⁺

R.2.1 Activité ATPase de CadA_{LM} en absence de Mg²⁺

R.2.2 Phosphorylation de CadA_{LM} en absence de Mg²⁺

R.2.2.1 Phosphorylation par l'ATP selon de la concentration de cadmium

R.2.2.2 Déphosphorylation du dérivé phosphorylé en fonction du temps

R.2.2.3 Déphosphorylation du dérivé phosphorylé par la dilution isotopique

R.2.2.4 Le dérivé phosphorylé formé à 500 µM de cadmium est sensible à l'ADP.

R.2.2.5 La phosphorylation par le CdPi

R.2.3 Phosphorylation de CadA_{LM} en présence de Mg²⁺

R.2.4 Les effets de Mg²⁺ sur CadA_{LM}

R.2.5 Phosphorylation par l'ATP en présence d'autres métaux

R.3 Identification et caractérisation des sites de transport de CadA_{LM}

R.3.1 Analyse préliminaire de CadA_{LM}

R.3.2 Choix des acides aminés

R.3.3 Le test phénotypique comme outil de prédiction.

R.3.4 Test phénotypique des mutants de CadA_{LM}

R.3.5 Etude de CadA_{LM} et ses variants par protéolyse ménagée

R.3.6 Analyse biochimique des mutants de CadA_{LM}

R.4 Chimères d'ATPases

R.4.1 Chimères de grandes boucles

R4.1.1 Analyse phénotypique des chimères produites dans la levure

R4.1.2 Immunodétection des ATPases chimériques

R4.1.3 Analyse fonctionnelle des chimères

R.4.2 Chimères des domaines N et P de CadA_{LM}

Discussion

ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

ARN : Acide ribonucléique

ARS : Autonomously Replicating Sequence

ATP : Adénosine triphosphate

CEN : Centromère

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EGTA : Ethylene Glycol-bis(β -aminoethyl ether)N, N, N', N', Tetraacetic Acid

HMA : Heavy Metal Associated

IRT : Iron-Regulated Transporter

kDa : Kilodalton

MBD : Metal Binding Domain

MT : Métallothionéine

ORF : Open Reading Frame

PCR : Polymerase Chain Reaction

PC : Phytochélatine

Pi : Phosphate inorganique

PMCA : Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SERCA : Sarco Endo-plasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase

ZIP : ZRT, IRT-like Protein

ZRT : Zinc-Regulated Transporter

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

Introduction

I.1 CadA de *Listeria monocytogenes*

Une étude accomplie en 1992 indique que 35.8% des *Listeria monocytogenes* sont des cellules résistantes au cadmium (Lebrun *et coll.*, 1992). Ces cellules présentent une concentration minimale inhibitrice (CMI) de CdSO₄ comprise entre 32 et 128 µg/ml alors que la CMI des cellules sensibles au cadmium oscille entre 4 et 8 µg/ml. Dans 87.2% des cas, il a été montré que la résistance au Cd²⁺ est associée à la présence de plasmides (neuf différents plasmides ont été recensés: pLm27, pLm40, pLm71, pLm74, pLm101, pLm106, pLm141, pLm173, pLm176). Le séquençage du plasmide pLm74 (qui présente la taille la plus faible) révèle une phase ouverte de lecture (ORF: open reading frame) de 2136 paires de bases encodant un polypeptide de 711 acides aminés qui présente 65.8% de similarité de séquence avec la protéine **CadA** de *Staphylococcus aureus*, **CadA_{SA}** (Silver *et al.*, 1992). Le gène du plasmide pLm74, qui est similaire au gène *CADA* de *S. aureus*, permet non seulement à *L. monocytogenes* mais aussi à *B. subtilis* (transformé par le même plasmide pLm74) de résister à des concentrations en cadmium de 512 et 256 µM au lieu des 16 et 8 µM observés lorsque ce plasmide est absent (Lebrun *et coll.*, 1994b). Le gène déterminant dans le plasmide pLm74 appelé aussi *CADA* est situé entre un transposon fonctionnel nommé Tn5422 qui est présent dans les plasmides de toutes les cellules testées de *L. monocytogenes* résistantes au cadmium. L'existence de Tn5422 explique la dissémination et la transmission de cette résistance dans l'espèce et pourrait apporter un avantage pour la survie dans l'environnement (Lebrun *et coll.*, 1994a). La thèse présentée ici porte sur la protéine **CadA_{LM}** de *L. monocytogenes* dont le gène porté par le plasmide pLm74 nous a été gracieusement donné par Pascale Cossard de l'Institut Pasteur de Paris.

I.2 Les ATPases de type P

L'analyse de la séquence du gène *CADA* provenant du plasmide pLm74 de *Listeria monocytogenes* par homologie (BLAST-P) montre que la protéine encodée par *CADA* fait partie des ATPases de type P, une vaste famille d'enzymes représentées chez les archaebactéries, les bactéries et les eucaryotes. Ces protéines localisées dans les membranes plasmiques des cellules ainsi que dans les membranes d'organites intracellulaires transportent, à travers la membrane et contre leur gradient électrochimique, une grande variété de cations aussi divers que Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^+ , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , H^+ grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Les ATPases de type P sont ainsi nommées car elles sont caractérisées par la formation, au cours de leur cycle catalytique, d'un intermédiaire phosphorylé covalent. Cet intermédiaire résulte du transfert du phosphate- γ de l'ATP sur un résidu aspartate, conservé parmi toutes les ATPases de type P, pour former une liaison acyl-phosphate. Cette phosphorylation est intimement liée au processus de transport ionique (Skou, 1960). Contrairement aux autres ATPases, les ATPases de type P sont constituées d'une sous-unité catalytique unique (Lutsenko et Kaplan, 1995; Solioz et Vulpe, 1996), et accessoirement, d'une ou deux sous-unités additionnelles régulatrices (Palmgren et Axelsen, 1998). La taille des ATPases varie de 68 kDa pour l'ATPase- Cd^{2+} de *Synechocystis* PCC6803 (Kaneko *et coll.*, 1996) à 230 kDa pour l'ATPase ATP1 de fonction inconnue de *Plasmodium falciparum* (Krishna *et coll.*, 1993). Le rôle des ATPases de type P est très varié et diffère selon l'espèce et le lieu où elles sont exprimées. Elles sont principalement chargées de l'homéostasie ionique et de la génération de gradients électrochimiques qui, à leur tour, fournissent l'énergie nécessaire pour des processus vitaux incluant la sécrétion, l'absorption, la signalisation transmembranaire, la transmission des impulsions nerveuses, le couplage excitation/contraction du muscle, la croissance et la différenciation cellulaire (Scarborough, 1999).

I.3 Caractéristiques de la séquence protéique des ATPases de type P

Les ATPases de type P ont des caractéristiques communes au niveau de la topologie et de la séquence primaire. Elles possèdent un grand domaine cytoplasmique qui contient le site de fixation de l'ATP (domaine N) et le site de phosphorylation (domaine P). Ce domaine contient 3 séquences d'acides aminés conservées, les motifs DKTGT, MxTGD et TGDGxNDxP (selon le code à une lettre des acides aminés), et qui servent à identifier sans ambiguïté une ATPase de type P (Fagan et Saier, 1994; Lutsenko et Kaplan, 1995; Møller *et coll.*, 1996; Axelsen et Palmgren, 1998). Le motif DKTGT est le site de phosphorylation: il contient l'aspartate qui est phosphorylé au cours du cycle enzymatique. Le motif MxTGD, localisé en aval du motif DKTGT, est important pour la phosphorylation. Il est supposé être le site de fixation de l'ATP qui est situé dans une « poche » formée par plusieurs acides aminés dont une lysine conservée parmi les ATPases de type P. Le motif DGDGxNDxP est situé en C-terminal du domaine catalytique dans une région appelée « hinge » pour « charnière » (Fig.I1).

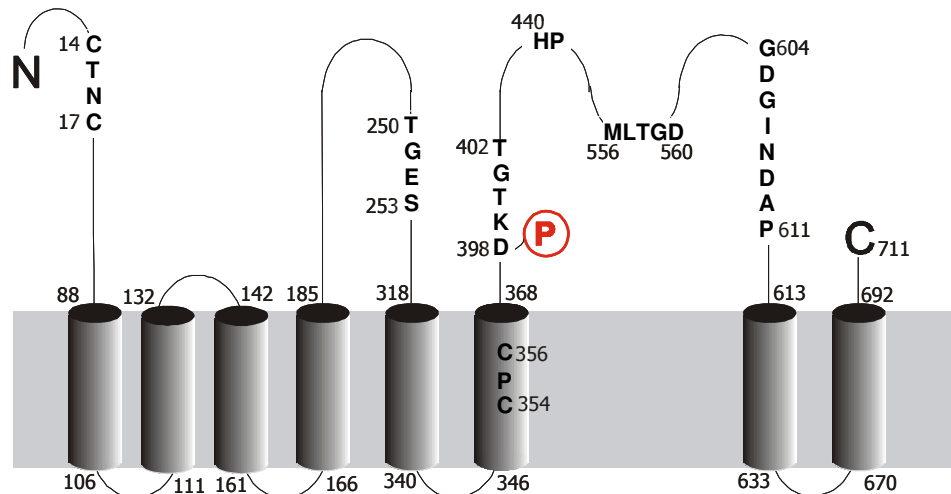


Figure I1. Caractéristiques communes aux ATPases de type P_I et présentées par **CadA_{LM}** de *L. monocytogenes*

En dehors du grand domaine cytoplasmique, les ATPases de type P possèdent une séquence commune supplémentaire, située dans le petit domaine cytoplasmique (domaine A), le motif TGE. L'importance de ce motif a été bien documentée dans l'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a: la mutagenèse de chacun des acides aminés de ce motif abolit l'activité ATPase ou la phosphorylation par l'ATP (Liste des mutations dans Fagan et Saier, 1994).

I.4 Classification des ATPases de type P

Les ATPases de type P sont répertoriées selon deux classifications, l'une réalisée par Svetlana Lutsenko et Jack Kaplan en 1995 (Figure I.2 (Lutsenko et Kaplan, 1995)) est fondée sur la topologie des protéines (classes P1 à P3) et l'autre, réalisée par Kristian Axelsen et Michael Palmgren en 1998 (Figure I.3 (Axelsen et Palmgren, 1998)), sur l'homologie de séquences primaires entre protéines (groupes I à V). Ces deux classifications sont corrélées au type d'ions transportés. Ainsi, dans une même classe, une ATPase provenant d'un organisme est plus proche des ATPases de sa classe et d'organismes lointains que des ATPases du même organisme, mais d'une autre classe. La classification présentée ici est celle d'Axelsen, les correspondances avec la classification de Lutsenko sont indiquées.

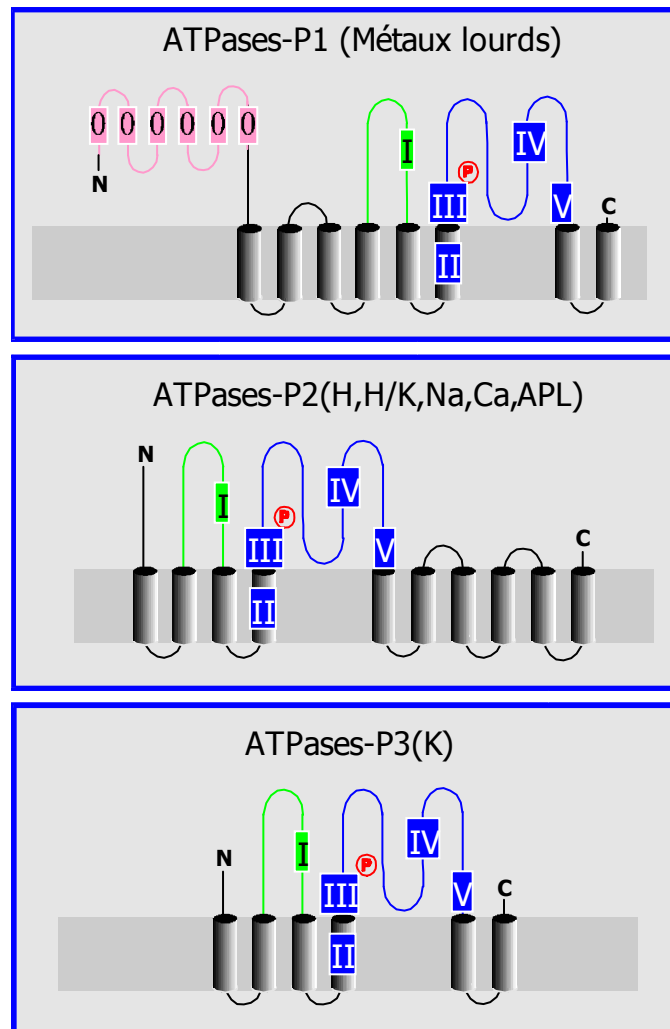


Figure I2. Classification des ATPases de type P d'après (Lutsenko et Kaplan, 1995)

— : petit domaine cytoplasmique; — : grand domaine cytoplasmique;

— : domaine aminoterminal des ATPases-P1;

Motif 0 : CxxC, liaison des métaux (ATPases-P1); Motif I : TGES ;

Motif II : CP (ATPases-P1), VPE (ATPases-P2/3);

Motif III : DKTGT (phosphorylation); Motif IV : MLTGD; Motif V : GDGxNDxP

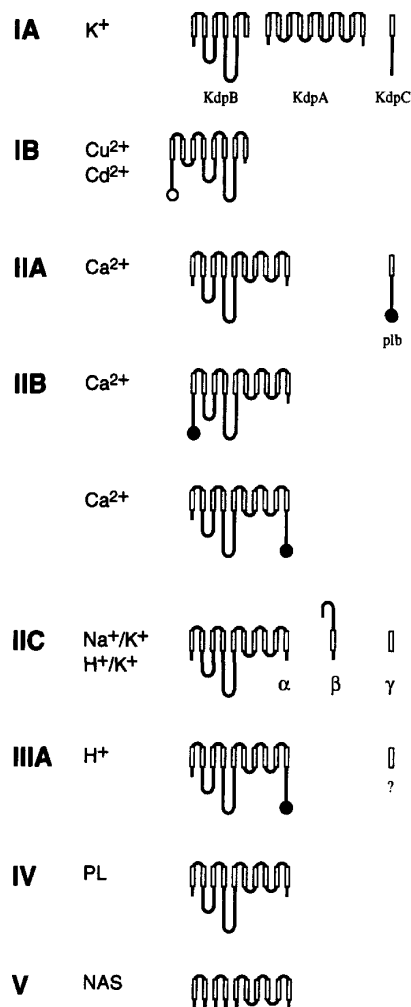


Figure I3. Classification des ATPases de type P d'après (Axelsen et Palmgren, 1998)

I.4.1 Les ATPases de type P_i

Les ATPases de type P_i regroupent les sous-types P_{iA} et P_{iB} . En marge des autres ATPases de type P constituées d'une sous-unité catalytique unique, les ATPases de type P_{iA} sont les ATPases Kdp constituées de 3 sous-unités et impliquées dans le transport des ions potassium; la sous-unité catalytique KdpB qui

hydrolyse l'ATP est apparentée aux ATPases de type P bien qu'elle comprenne un nombre réduit d'hélices transmembranaires. La sous-unité KdpA semble être un canal ionique pour le transport des ions K^+ (Møller *et coll.*, 1996; Palmgren et Axelsen, 1998). La sous-unité KdpC pourrait stabiliser le complexe entre KdpA et KdpB. Elles ne fonctionnent pas en sous-unité unique, mais font partie de machines moléculaires complexes qui pompent activement les ions potassium (Lutsenko et Kaplan, 1995). Ces protéines représenteraient les ancêtres des ATPases de type P actuelles, dont les domaines d'hydrolyse de l'ATP et de fixation du cation auraient fusionnés. Ce sont des ATPases inductibles, de haute affinité pour les ions potassium et qui permettent l'entrée de K^+ dans la cellule. Elles sont exprimées en cas d'urgence, dans les conditions de croissance où les systèmes constitutifs de capture du potassium sont incapables de maintenir le niveau cellulaire nécessaire (Altendorf *et coll.*, 1998). Dans la classification de Lutsenko (Figure I.2), elles correspondent aux ATPases de type P3.

Les ATPases de type P_{IB} (Figure I.3), un autre sous-type des ATPases de type P_I , sont impliquées dans le transport de métaux lourds essentiels tels que le cuivre ou le zinc ainsi que de métaux lourds toxiques tels que le cadmium ou le plomb. Ce sous-type est le plus répandu, à en juger par sa présence chez les archaebactéries, les bactéries et les eucaryotes (Okamura *et coll.*, 2003). Les ATPases de type P_{IB} sont impliquées aussi bien dans l'import des métaux lourds que dans leur export. Elles jouent un rôle fondamental dans la résistance au cadmium et au plomb et par ailleurs elles régulent l'homéostasie du zinc ou du cuivre dans la cellule (Rensing *et coll.*, 2000). Les ATPases- Cu^+ identifiées chez l'homme se nomment ATPases de Menkes et de Wilson. Dans des conditions basales, ces ATPases se situent dans la membrane de l'appareil de Golgi (Camakaris *et coll.*, 1999; Mercer, 2001). Dans des conditions de concentrations en Cu^+ élevées, les ATPases de Menkes et de Wilson sont redistribuées vers la membrane plasmique de façon à expulser le cuivre hors de la cellule. Des mutations des gènes encodant ces deux ATPases conduisent aux maladies de Menkes et de Wilson, liées, la première à une déficience en cuivre (Menkes *et coll.*, 1962; Vulpe *et coll.*, 1993) et la seconde à son accumulation dans le foie ou le cerveau (Bull *et coll.*, 1993). Les ATPases- P_{IB} présentent quatre caractéristiques spécifiques (Fig.I2):

- leur domaine N-terminal est plus grand que celui des ATPases-P_{II} et comprend un ou plusieurs motifs (jusqu'à 6) Cys-x-x-Cys, motifs que l'on trouve dans d'autres protéines impliquées dans la liaison de métaux tel que les métallo-chaperonnes (Arnesano *et coll.*, 2002). Dans ce motif, les cystéines sont directement impliquées dans la coordination du métal.

- le domaine transmembranaire des ATPases-P_{IB}, dont la partie C-terminale est plus courte que celle des ATPases-P_{II}, posséderait 8 hélices alors que les ATPases-P_{II} en ont 10.

- le sixième segment transmembranaire dont l'équivalent est essentiel dans le cas du transport de calcium par les ATPases-Ca²⁺ comporte une séquence Cys-Pro-Cys/His très conservée au sein des ATPases-P_{IB}.

- le grand domaine cytoplasmique des ATPases-P_{IB} contient un motif HP conservé.

CadA_{LM} que nous avons utilisé au cours de ma thèse appartient à cette famille d'ATPases.

Dans la classification de Lutsenko (Figure I.3), les ATPases de type P_I sont regroupées dans le type P1.

1.4.2 Les ATPases de type P_{II}

Les ATPases de type P_{II} transportent des cations de masse atomique plus faible que les ATPases de type P_I. Elles regroupent les sous-types P_{IIA}, P_{IIB}, P_{IIC} et P_{IID} qui transportent les ions comme Ca²⁺, H⁺, K⁺, Na⁺. Cette classe comprend les protéines les plus connues parmi les ATPases de type P, comme les ATPases-Ca²⁺ et -Na⁺/K⁺. Les ATPases des sous-types P_{IIA} et P_{IIB} sont impliquées dans le transport de Ca²⁺ alors que les sous-types P_{IIC} et P_{IID} comprennent les ATPases-Na⁺/K⁺, H⁺/K⁺ et l'ATPase-Na⁺, respectivement.

Les ATPases de type P_{IIA} et P_{IIB} impliquées dans l'homéostasie calcique sont présentes au niveau des membranes plasmiques et des membranes intracellulaires des réticulums endo- et sarco-plasmiques (Møller *et coll.*, 1996). Dans les cellules de mammifères, plusieurs ATPases-Ca²⁺ ont été répertoriées: trois isoformes

d'ATPases- Ca^{2+} dans le réticulum sarco- ou endo-plasmique: SERCA 1 à 3 (Sarco Endo-plasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase), quatre dans la membrane plasmique: PMCA 1 à 4 (Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase) et deux dans la voie de sécrétion: SPCA 1 et 2 (Secretory Pathway Ca^{2+} -ATPase) (Shull, 2000).

Les ATPases de type P_{IIc} requièrent la présence d'une sous-unité régulatrice (β) en plus de la sous-unité (α) qui contient les sites de fixation des métaux à transporter et de l'ATP et le site de phosphorylation pour effectuer leur fonction de transport. Les ATPases- Na^+/K^+ des membranes plasmiques des animaux permettent la régulation du volume cellulaire, le développement du potentiel membranaire et le transport de nutriments dépendant du sodium (Møller *et coll.*, 1996). Les ATPases- H^+/K^+ de la muqueuse gastrique catalysent l'échange des protons intracellulaires contre les ions potassium extracellulaires, générant ainsi un pH acide utilisé dans la phase gastrique de la digestion (Møller *et coll.*, 1996). Ces protéines ne sont présentes que dans les cellules animales et pourraient être les équivalents des ATPases à protons de la membrane plasmique des microorganismes ou des plantes.

Les ATPases de type P_{IId} seraient des transporteurs de Na^+ , suggestion basée sur le fait que la délétion du gène codant une de ces ATPases dans la levure *S. cerevisiae* augmente la sensibilité de la souche au Na^+ .

Les ATPases de type P_{II} sont composées de 10 segments transmembranaires. L'organisation des segments membranaires n'est pas la même que pour les ATPases de type P_{I} : seule une paire de segments membranaires est localisée en amont de la petite boucle et trois paires en aval de la grande boucle pour les ATPases de type P_{II} alors que deux paires de segments membranaires sont localisées en amont de la petite boucle et une paire en aval de la grande boucle pour les ATPases de type P_{I} .

Dans la classification de Lutsenko (Figure I.3), les ATPases de type P_{II} sont regroupées dans le type P2.

1.4.3 Les ATPases de type P_{III}

Les ATPases de type P_{III} regroupent les sous-types P_{IIIA} et P_{IIIB}. Les ATPases de type P_{IIIA} correspondent aux ATPases-H⁺ de la membrane plasmique des plantes, des champignons et des archéobactéries. Ces ATPases expulsent les protons dans le milieu extracellulaire de façon à créer le gradient électrochimique nécessaire à l'assimilation des nutriments. Le type P_{IIIB} comprend un petit groupe additionnel d'ATPases-Mg²⁺ de bactéries. Les ATPases-Mg²⁺ des procaryotes, MgtA et MgtB, sont localisées dans la membrane plasmique bactérienne. Elles permettent l'influx d'ions Mg²⁺ dans le sens du gradient électrochimique. L'expression des deux protéines est induite par des conditions de carence en Mg²⁺ (Moncrief et Maguire, 1999).

Dans la classification de Lutsenko (Figure I.3), les ATPases de type P_{III} sont regroupées dans le type P2.

1.4.4 Les ATPases de type P_{IV}

Les ATPases de type P_{IV} regroupent une famille d'enzymes impliquées dans le transport d'aminophospholipides (Tang *et coll.*, 1996). Des ATPases de transport d'aminophospholipides ont été découvertes et étudiées chez la levure (Chen *et coll.*, 1999), les plantes (Gomes *et coll.*, 2000), le bœuf (Auland *et coll.*, 1994) et l'homme (Mouro *et coll.*, 1999). Elles seraient à l'origine de l'asymétrie de la bicouche lipidique (Halleck *et coll.*, 1998). Les ATPases de type P_{IV} diffèrent des autres ATPases de type P essentiellement au niveau des acides aminés des segments transmembranaires impliqués dans la fixation des cations à transporter. Les résidus chargés négativement sont remplacés par des acides aminés à chaînes latérales hydrophobes (Tang *et coll.*, 1996).

Les ATPases de type P_{IV} ne sont pas considérées dans la classification de Lutsenko (Figure I.3).

1.4.5 Les ATPases de type P_V

Le groupe d'ATPases de type P_V regroupe des ATPases sans spécificité connue. A cause du manque de données relatives à leur caractérisation biochimique, elles ont été classées à part (Catty *et coll.*, 1997; Axelsen et Palmgren, 1998). Ces ATPases se distinguent par leur présence exclusive dans les organismes eucaryotes. Leur structure est inhabituelle par rapport aux autres ATPases de type P: elles possèdent un long domaine extra-membranaire de 100 à 200 résidus entre les hélices transmembranaires 1 et 2 et des séquences consensus qui ne sont pas détectées dans les autres groupes (Catty *et coll.*, 1997). Ce groupe pourrait inclure les ATPases transportant des anions, comme l'ATPase-Cl⁻ d'*Aplysia californica* (Gerencser et Zhang, 2003).

Les ATPases de type P_V ne sont pas considérées dans la classification de Lutsenko (Figure I.3).

1.5 Les transporteurs actifs

La probabilité pour qu'un ion traverse spontanément la partie interne hydrophobe de la double couche lipidique d'une membrane biologique est faible. En effet, la membrane est constituée de phospholipides et de glycolipides qui, par leurs longues chaînes carbonées (de C14 à C24), lui confèrent un caractère hydrophobe, chimiquement opposé au passage de l'ion.

Les ions traversent donc la membrane grâce à des protéines transmembranaires, intervenant dans deux types de transport: le transport passif et le transport actif.

Le transport passif (ou diffusion facilitée) met en jeu les canaux ioniques. Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires qui aménagent un pore pour

le passage ionique. Ces protéines permettent le passage d'un ion dans le sens de son gradient électrochimique, avec un flux de l'ordre de 10^6 - 10^8 ions/seconde.

Le transport actif d'un ion contre son gradient électrochimique suppose un apport d'énergie. Dans ce type de transport, le flux est faible: de 1 à 1000 ions transportés par seconde. Deux sources d'énergie coexistent dans la cellule: l'énergie métabolique telle que celle stockée dans l'ATP et libérée lors de son hydrolyse sous forme d'ADP et de P_i , et l'énergie électrochimique stockée dans les gradients transmembranaires d'ions. Les transporteurs qui utilisent l'énergie stockée dans l'ATP pour transporter des ions et qui réalisent le couplage entre transport et réaction chimique sont dits transporteurs actifs primaires. Les transporteurs qui couplent le transport de deux ions en utilisant le gradient électrochimique de l'un pour transporter l'autre sont dits transporteurs actifs secondaires, comme par exemple les systèmes de co-transport qui comprennent les symports (transfert simultané de deux ions dans le même sens) et les antiports (transfert en sens opposé). Les ATPases de type P comme **CadA_{LM}** sont des transporteurs actifs primaires qui utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter des ions contre leur gradient électrochimique.

I.6 Caractéristiques enzymatiques des ATPases de type P

L'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a du réticulum sarcoplasmique découverte simultanément par Ebashi (1961) et Hasselbach et Makinose (1961) est l'une des ATPases de type P les plus étudiées sur le plan enzymatique. Même si le fonctionnement de l'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a n'est probablement pas exactement le même que celui d'autres ATPases de type P, il est communément utilisé comme modèle enzymatique de cette famille de transporteurs (Fig.14). Deux Ca^{2+} sont transportés pour chaque molécule d'ATP hydrolysée (Hasselbach et Makinose 1962, Makinose et Hasselbach 1971).

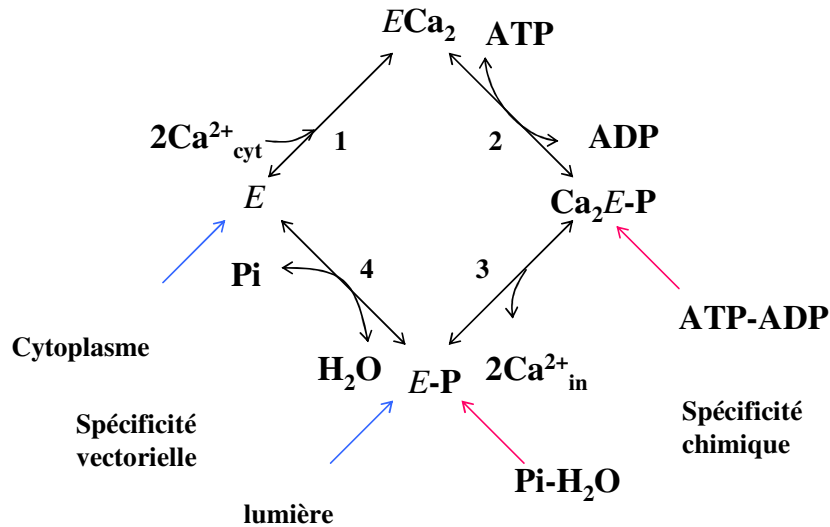


Figure I4. Cycle enzymatique modèle de Serca selon (Jencks, 1989).

1.6.1 La fixation du Ca^{2+}

La première étape du fonctionnement de Serca1a est la fixation des Ca^{2+} aux sites de transport accessibles du cytoplasme (Figure I4, étape 1). Les ions se lient séquentiellement à l'ATPase- Ca^{2+} (Dupont 1982). L'affinité est sub-micromolaire ce qui assure à l'ATPase- Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique la possibilité de ramener la concentration intracellulaire de Ca^{2+} à sa valeur de repos ($\sim 0.1 \mu M$). Les deux Ca^{2+} fixés aux sites de transport sont échangeables avec le milieu.

1.6.2 Phosphorylation de l'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a en présence de Ca^{2+}

Après la fixation des deux Ca^{2+} a lieu la phosphorylation de l'enzyme par l'ATP (Figure I4, étape 2). La formation du dérivé phosphorylé covalent se produit par transfert du phosphate γ de l'ATP sur l'aspartate de la séquence DKTGT, conservé parmi toutes les ATPases de type P, et s'accompagne de la libération d'ADP. Dans cet état phosphorylé, les Ca^{2+} fixés à la protéine ne sont pas échangeables avec le

milieu et pas non plus susceptibles d'être chélatés par l'EGTA. Les sites de fixation du Ca^{2+} sont dits occlus.

1.6.3 Déphosphorylation de l'ATPase- Ca^{2+} phosphorylé

La suite du cycle consiste en la libération des Ca^{2+} de l'autre côté de la membrane (Figure I4, étape 3), puis la déphosphorylation de l'enzyme (Figure I4, étape 4). Une molécule d'eau est consommée pour hydrolyser la liaison acyl-phosphate et libérer du phosphate inorganique (Pi). Après la déphosphorylation de l'enzyme, l'ATPase- Ca^{2+} , revenue à l'état initial, peut recommencer un nouveau cycle enzymatique.

1.6.4 Réversibilité du cycle enzymatique de l'ATPase- Ca^{2+}

Le cycle enzymatique de l'ATPase- Ca^{2+} est réversible. Il commence par la phosphorylation par Pi qui ne peut se produire qu'en absence de Ca^{2+} (Figure I4, étape 4 en sens inverse). Le dérivé phosphorylé covalent se forme sur le même aspartate, conservé parmi toutes les ATPases de type P, formant un acyl-phosphate. Ensuite, si l'ATPase dispose de Ca^{2+} et d'ADP, elle synthétise de l'ATP (Knowles et Racker, 1975). Cette synthèse se produit spontanément si la membrane qui contient l'ATPase est refermée sur un volume plein de Ca^{2+} mimant la lumière du réticulum. En présence d'ADP, le gradient de Ca^{2+} fournit l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP (Figure I4, étapes 3 et 2 en sens inverse).

Les deux dérivés phosphorylés décrits dans le cycle, l'un obtenu par l'ATP en présence de Ca^{2+} et l'autre par le Pi en absence de Ca^{2+} possèdent des caractéristiques différentes. Le premier est sensible à l'ADP, c'est-à-dire que l'on peut reverser le cycle en ajoutant un excès d'ADP afin de synthétiser de l'ATP; le second est insensible à l'ADP, c'est-à-dire que l'on ne peut reverser le cycle même en ajoutant un excès d'ADP pour synthétiser l'ATP (Shigekawa et Dougherty, 1978).

I.7 Changements de conformation des ATPases de type P

Depuis la découverte de l'activité ATPase des fibres du muscle en 1939 (Engelhardt *et al*, 1939), l'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a a fait l'objet de recherches intensives sur ses caractéristiques enzymatiques. Le grand changement de vision sur l'ATPase- Ca^{2+} se produit au début des années 60 quand Hasselbach et Makinose ont mis en évidence le transport de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ à l'intérieur de vésicules de réticulum sarcoplasmique par une ATPase de la membrane de ces vésicules (Hasselbach et Makinose, 1961) (c'était l'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a encore inconnue à l'époque). On saisit alors l'étroite intrication entre l'événement chimique (hydrolyse d'ATP) et l'événement vectoriel (transport du Ca^{2+}) qui ne doivent pas pouvoir se produire l'un sans l'autre pour que le couplage de la pompe soit effectif.

Mais la question fondamentale posée par ce mécanisme de couplage reste à élucider : où et comment est transférée l'énergie libérée par l'hydrolyse d'ATP ? Comment cette énergie contenue dans la liaison covalente aspartyl-phosphate permet-elle le transfert des Ca^{2+} au travers de la protéine ? Depuis 40 ans maintenant, la réponse est recherchée dans la structure de l'ATPase- Ca^{2+} . Il est généralement accepté que l'énergie libérée par l'hydrolyse d'ATP est d'abord utilisée pour changer la structure de l'ATPase et les changements de conformation de la protéine qui aboutissent ensuite au transport du Ca^{2+} ont fait l'objet de recherches intensives.

I.7.1 Etude des changements de conformation par fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est depuis longtemps appliquée à la détection des changements de conformation de l'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a. Les variations de l'intensité de fluorescence venant de la modification de l'environnement du fluorophore permettent d'étudier les changements de conformation de la protéine. Le suivi de la fluorescence intrinsèque présente l'avantage de ne pas modifier la structure et l'activité biologique de la protéine. Il est cependant rare qu'une protéine soit constituée d'un fluorophore unique et les changements de conformation observés doivent par conséquent être interprétés comme un changement de structure global de la protéine. Lorsque l'on excite l'ATPase vers 280-290 nm, la

protéine émet une fluorescence dont le maximum est centré sur 330 nm. Les premières mesures de fluorescence intrinsèque ont été accomplies en 1976 (Dupont, 1976); il a alors été démontré que l'intensité de fluorescence de l'ATPase était sensible à la fixation de Ca^{2+} sur l'enzyme. L'addition de Ca^{2+} conduit à une augmentation de 4 à 6 % de l'intensité de fluorescence, phénomène réversible après ajout d'un chélateur de Ca^{2+} comme l'EGTA. La fixation du complexe MgATP au site de fixation du nucléotide, en absence de Ca^{2+} , produit également une augmentation de l'intensité de fluorescence bien que plus faible que celle observée par fixation du Ca^{2+} . Les variations de fluorescence associées à la fixation d'ATP indiquent une constante de dissociation équivalente à celle mesurée à l'aide de nucléotides radioactifs (Dupont *et coll.*, 1988). Par ailleurs, la phosphorylation de l'ATPase par le P_i , en absence de Ca^{2+} et en présence de Mg^{2+} , est accompagnée d'une augmentation de l'intensité de fluorescence d'environ 4 % (Lacapère *et coll.*, 1981).

1.7.2 Etude des changements de conformation par protéolyse ménagée

La protéolyse ménagée s'est avérée être un autre outil pour étudier les changements de conformation des ATPases de type P. En partant du principe qu'un site sensible à la protéolyse est accessible au solvant, les changements de comportement de l'ATPase vis-à-vis de la trypsine après fixation de différents ligands doivent être intimement liés à des changements de conformation de l'enzyme durant le cycle de transport. Cette méthode a par exemple permis de montrer l'existence d'un changement de conformation de la petite boucle cytoplasmique après la fixation de Ca^{2+} à l'enzyme (Imamura *et coll.*, 1984; Saito *et coll.*, 1984). La présence de deux conformations distinctes de l'enzyme phosphorylée, l'une sensible à l'ADP et l'autre insensible à l'ADP a également été caractérisée grâce aux sensibilités différentes de ces deux intermédiaires à la trypsine (Andersen *et coll.*, 1985).

1.7.3 Etude des changements de conformation par structure cristalline

Les études structurales de l'ATPase- Ca^{2+} ont débuté au début des années 80 lorsque les vésicules de réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique rapide de lapin formant des cristaux bidimensionnels en présence de vanadate ont été

produites (Dux et Martonosi, 1983). Ces cristaux étaient utilisables pour l'étude de la structure de l'ATPase par microscopie électronique. Les premiers cristaux tridimensionnels permettant une analyse fine par diffraction aux rayons X ont permis d'aboutir à la structure de l'ATPase- Ca^{2+} à une résolution de 2.6 Å (Toyoshima *et coll.*, 2000). Quatre différentes structures ont été identifiées jusqu'à présent dans les conditions suivantes : en absence de Ca^{2+} et d'ATP, en présence de deux Ca^{2+} au site de transport, en présence de Mg^{2+} et d'un analogue d'ATP au site catalytique et en présence de deux Ca^{2+} au site de transport, et en présence de Mg^{2+} et d'un analogue de Pi au site catalytique (Toyoshima *et coll.*, 2000; Toyoshima et Nomura, 2002; Toyoshima et Mizutani, 2004). Les quatre structures sont distinctes les unes des autres. La structure en présence de Ca^{2+} montre qu'il y a deux sites membranaires de fixation du Ca^{2+} côte à côte: les sites notés I et II (Figure I5), séparés de 5.7 Å, et approximativement à la même distance de la surface de la membrane. Le site I est situé dans l'espace entre les hélices 5 et 6 et est composé des ligands oxygène des chaînes latérales de Asn768 (M5), Glu771 (M5), Thr799 (M6), Asp800 (M6) et Glu908 (M8). Dans le site II, le calcium est coordonné par les atomes d'oxygène du squelette peptidique de Val304, Ala305 et Ile307 (M4) et par ceux des chaînes latérales de Glu309 (M4), Asn796 et Asp800 (M6). On retrouve dans l'environnement des deux Ca^{2+} les six acides aminés mis en évidence par mutagenèse dirigée (Clarke *et coll.*, 1989) : Glu 309 (M4), Glu771 (M5), Asn796 (M6), Thr799 (M6), Asp800 (M6) et Glu908 (M8). Les acides aminés dont la liaison peptidique est engagée dans la liaison du Ca^{2+} n'avaient pas été détectés. L'asparagine 768 dont la mutation en alanine diminue de 30% l'activité de transport n'avait pas non plus été envisagée comme faisant partie du site de transport (Clarke 1990)

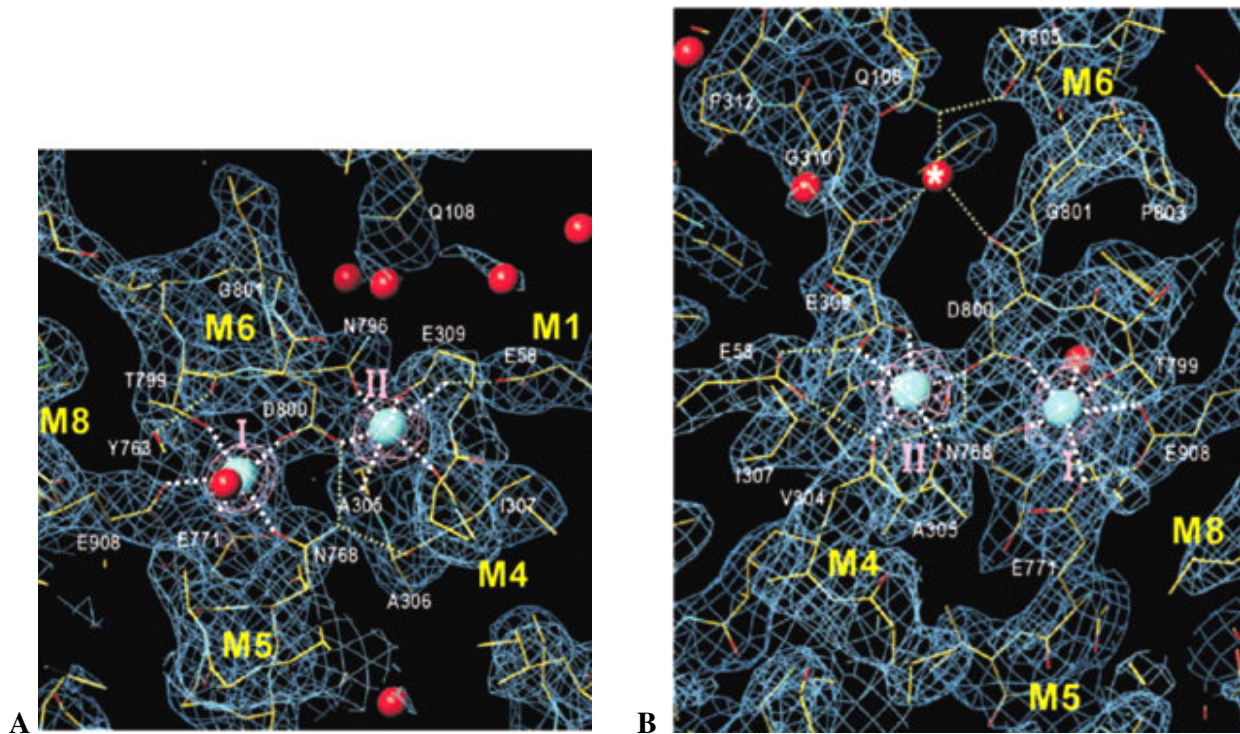


Figure I5. Sites de liaison du Ca^{2+} A. Vue en plan (face cytoplasmique) B. Vue en coupe

I.8 Cycle catalytique des ATPases de type P

Malgré des recherches intensives sur les caractéristiques enzymatiques des ATPases de type P et leurs changements de conformation, aucun mécanisme qui tente de relier les caractéristiques enzymatiques et la structure ne satisfait tout le monde. Pour simplifier la présentation, le cycle enzymatique proposé par de Meis et Vianna et décrit Figure I6 (de Meis et Vianna, 1979) d'une part, et le modèle structural illustrant ce cycle proposé par Toyoshima (Toyoshima *et coll.*, 2004) d'autre part (Fig. I7) sont adoptés ici. Il est toutefois important de noter que dès 1973, Makinose proposait un modèle enzymatique simple mais toujours vrai du fonctionnement de l'ATPase- Ca^{2+} (Makinose 1973)

I.8.1 Le modèle E1-E2 (Fig. I6)

Le principe du fonctionnement des ATPases de type P est le couplage entre hydrolyse de l'ATP et transport de l'ion considéré. Ce couplage se traduit par une

alternance d'événements structuraux - changements de conformation - et chimiques, phosphorylation - déphosphorylation. Un tel couplage implique forcément un ordre, une séquentialité puisque seul l'événement n autorise l'événement $n+1$. En consultant les bases de données de protéines, on pourra constater que le terme « ATPase de type P » est souvent remplacé par le terme « ATPase E1-E2 ». E1-E2 se réfère au modèle enzymatique proposé par de Meis et Vianna pour l'ATPase- Ca^{2+} en 1979 (de Meis et Vianna, 1979) et inspiré d'un modèle initialement proposé pour l'ATPase- Na^+/K^+ (modèle dit d'Albers-Post, Glynn 1978). Le modèle E1-E2 fait apparaître deux conformations de l'enzyme : E1 est une forme de l'enzyme capable de lier les ions Ca^{2+} du côté cytoplasmique et d'être phosphorylée par l'ATP; E2 est une forme de l'enzyme dont les sites de transport sont orientés vers l'autre côté de la membrane et phosphorylable par le phosphate inorganique. Le modèle E1-E2 fait aussi apparaître une transition conformationnelle $\text{E2} \rightarrow \text{E1}$ dont on pense maintenant qu'elle correspond à une déprotonation de l'enzyme (Forge *et coll.*, 1993). Ce modèle étant théoriquement limité à 2 conformations ne rend pas compte de tous les états conformationnels de l'ATPase. Il a cependant été très utile pour formaliser le fonctionnement de l'ATPase- Ca^{2+} en particulier, et des ATPases de type P en général.

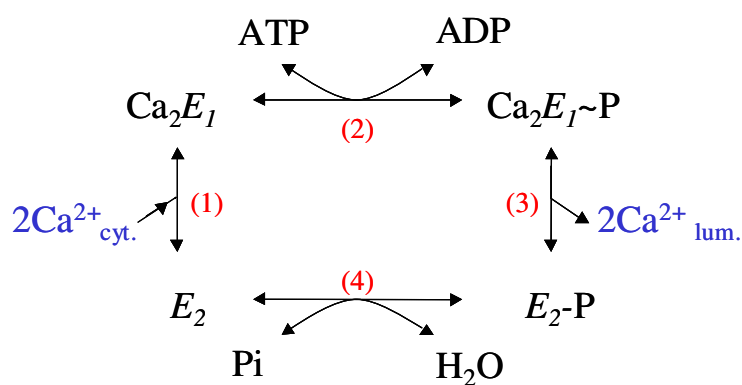


Figure I6. Cycle enzymatique modèle de Serca selon (de Meis et Vianna, 1979).

Un des traits fondamentaux de l'ATPase- Ca^{2+} est l'existence d'une forme occluse dans une étape associée au transport des ions (étape 3). Une autre caractéristique

importante de ce cycle est sa réversibilité à chaque étape. Les états E1 et E2, en plus d'être définis par rapport à leur affinité pour le calcium, sont aussi caractérisés par leur capacité à être phosphorylés respectivement par l'ATP et le phosphate inorganique. En présence de calcium, l'enzyme dans l'état E1 peut être phosphorylée par l'ATP. L'intermédiaire formé E1~P est dit de « haute énergie », c'est-à-dire qu'il peut être déphosphorylé par de l'ADP pour reformer de l'ATP. L'état E2 n'est réactif ni avec l'ATP, ni avec l'ADP. En revanche, en absence de calcium, il peut être phosphorylé par le phosphate inorganique, pour former l'état E2-P, dit de « basse énergie ». L'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a peut, dans certaines conditions, synthétiser de l'ATP en remontant le cycle étape par étape. La synthèse d'ATP commence par la phosphorylation spontanée de l'enzyme dans la forme E2 par le phosphate inorganique en absence de calcium et en présence de magnésium, ceci conduit à l'état E2-P (étape 4). Si ADP et Ca^{2+} à une concentration millimolaire sont ajoutés simultanément, alors les Ca^{2+} se fixent aux sites internes, induisant la formation de l'espèce $\text{Ca}_2\text{E1}\sim\text{P}$ (étape 3) qui, à son tour, fixe l'ADP et lui transfère son phosphate pour synthétiser une molécule d'ATP (étape 2).

1.8.2 Le modèle structural (Fig. 17)

Avec la résolution de différentes structures tridimensionnelles de l'ATPase liant le calcium, la thapsigargine, des analogues de l'ATP ou du phosphate, Toyoshima a récemment proposé un modèle faisant intervenir quatre changements structuraux majeurs de la protéine. Comme on pourra le noter dans le schéma, l'auteur bien qu'ayant quatre structures différentes de la protéine continue d'adopter la nomenclature E1-E2. On notera aussi qu'à part la forme liant le calcium, aucun des intermédiaires réactionnels vrais de l'enzyme n'a pu être cristallisé. Ceci est dû d'une part à l'instabilité que crée la solubilisation de l'enzyme par des détergents en absence de Ca^{2+} qui rend très difficile la cristallisation de la protéine sans Ca^{2+} , et d'autre part à l'instabilité intrinsèque du dérivé phosphorylé. A l'état E2 correspond une structure obtenue sans Ca^{2+} , mais stabilisée par la présence de thapsigargine, un sesquiterpène lactone qui s'insère dans la région membranaire de l'ATPase. A l'état $\text{Ca}_2\text{E1}\sim\text{P}$, Toyoshima d'une part et Sorensen d'autre part, font correspondre une structure obtenue en présence de Ca^{2+} , Mg^{2+} et ADPAIF₄. A l'état E2-P correspond

une structure obtenue en présence d'EGTA et de MgF_4^{2-} . Enfin, à l'état Ca_2E1ATP correspond une structure obtenue en présence de Ca^{2+} , Mg^{2+} et AMPPCP, un analogue non-hydrolysable de l'ATP. Ces différentes structures sont décrites dans (Toyoshima *et coll.*, 2000; Toyoshima et Nomura, 2002; Toyoshima *et coll.*, 2004; Toyoshima et Mizutani, 2004; Sorensen *et coll.*, 2004).

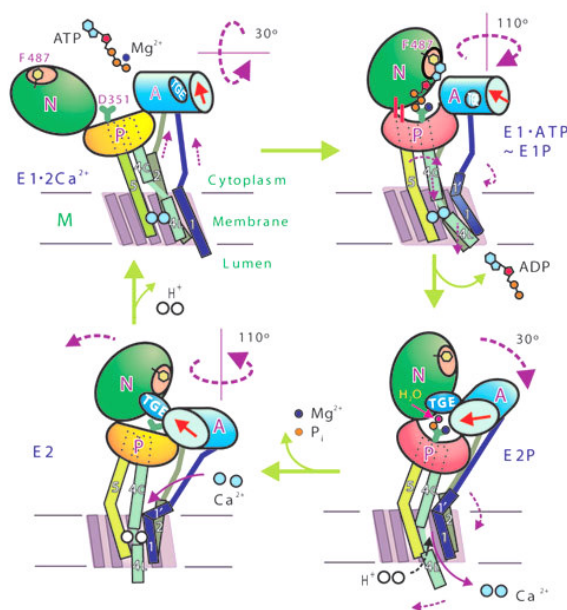


Figure I7. Modèle structural d'après (Toyoshima *et coll.*, 2000; Toyoshima et Nomura, 2002; Toyoshima *et coll.*, 2004; Toyoshima et Mizutani, 2004).

I.9 Objectifs de la thèse

Le cycle enzymatique des ATPases de type P_{11} reflète un étroit couplage entre hydrolyse de l'ATP et transport ionique. Le site de transport est un site membranaire capable de fixer le cation à transporter et susceptible de « déformations locales » permettant son orientation vers une face ou l'autre de la membrane. C'est la mise en évidence et la caractérisation de ce site sur les ATPases de type P_I qui fait l'objet de mon projet de thèse. Il est à noter qu'à l'heure actuelle aucune étude systématique

n'est parue sur l'identification des sites de transport membranaires des ATPases de type P_I.

Les études de mutagenèse dirigée sur l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a ont permis d'identifier quelques résidus acides ou neutres comme appartenant aux sites de transport. Ces résidus sont des acides glutamiques et aspartiques, une thréonine, une asparagine (Clarke *et coll.*, 1989). On remarquera que ces sites intramembranaires sont formés par des acides aminés appartenant à plusieurs hélices organisées en faisceau perpendiculairement au plan de la membrane. En nous inspirant de l'étude du site de transport du calcium de l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a, nous avons réalisé une série de mutagenèses dirigées ponctuelles visant des acides aminés chargés ou polaires des segments transmembranaires de l'ATPase-Cd²⁺ **CadA_{LM}**.

La quasi totalité des acides aminés suspectés de faire partie du site de transport ont été mutés sur **CadA_{LM}**. Nous avons employé une méthode originale pour cribler les mutants. En effet, nous avons mis au point un test phénotypique dans la levure *S. cerevisiae* qui permet de savoir si la protéine **CadA_{LM}** mutée est fonctionnelle ou non. Lorsque **CadA_{LM}** sauvage est exprimée dans *S. cerevisiae*, la levure ne pousse plus en présence de 1 µM de Cd²⁺, alors que sans expression de **CadA_{LM}** ou lorsque qu'elle produit une ATPase **CadA_{LM}** non-fonctionnelle, la levure pousse très bien dans les mêmes conditions. Ce phénotype « inverse » nous a permis de trier les mutants de **CadA_{LM}** selon le principe qu'une mutation ponctuelle d'un acide aminé composant le site de transport du cadmium affectera l'activité enzymatique de **CadA_{LM}** et se traduira par une modification de la sensibilité au cadmium de la levure exprimant ce mutant. Les mutants ainsi sélectionnés ont ensuite été étudiés biochimiquement.

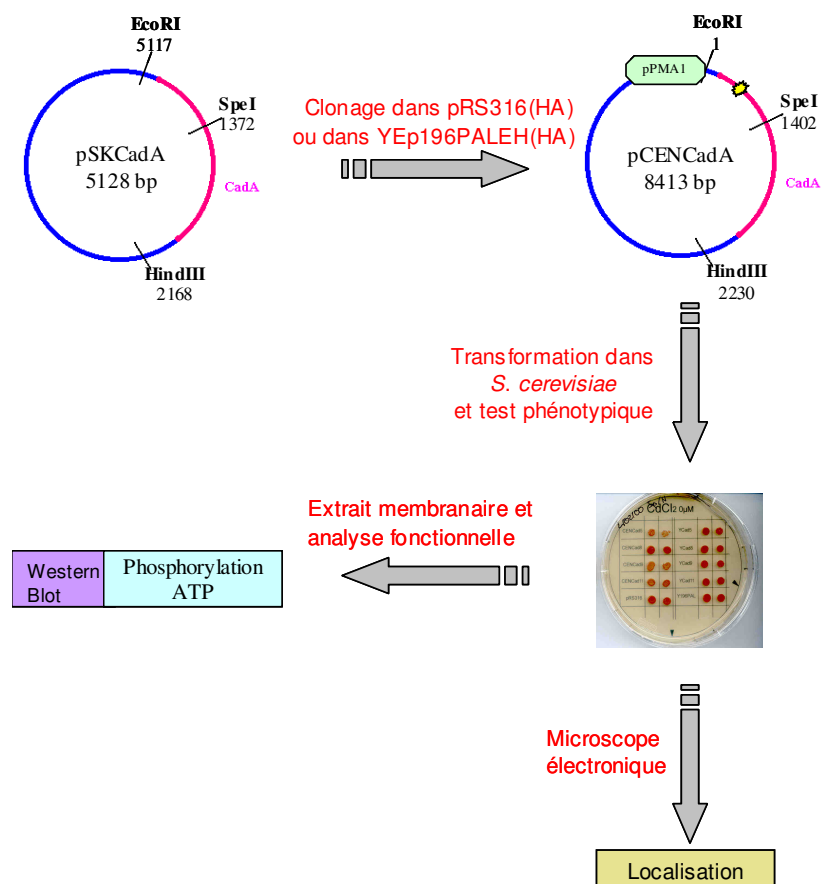
L'étude menée sur **CadA_{LM}** nous a permis d'acquérir des informations sur certains acides aminés qui apparaissent comme essentiels à la fixation du cadmium. Par extrapolation, ceci nous permettra de désigner les segments transmembranaires formant le faisceau de la voie de passage des ions, sur le modèle de la structure tridimensionnelle de l'ATPase Ca²⁺ SERCA1a, appliqué aux ATPases de type P_I.

Ainsi, au début de ma thèse et avec Nathalie Bal qui terminait son travail de thèse, nous avons développé l'expression de **CadA_{LM}** dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* et mis au point le phénotype de sensibilité au Cd²⁺. Les résultats concernant l'utilisation du phénotype obtenu lors de l'expression de **CadA_{LM}** sauvage et mutante dans la levure *S. cerevisiae* seront exposés (chapitre 1). Nous avons ensuite déterminé les caractéristiques enzymatiques de **CadA_{LM}** exprimée dans la levure et commencé une étude de sa spécificité ionique (chapitre 2). Une série de mutagenèses dirigées ponctuelles visant des acides aminés chargés ou polaires des segments transmembranaires de l'ATPase-Cd²⁺ **CadA_{LM}** a été réalisée (chapitre 3). Enfin, l'étude sur le site catalytique initiée par les chimères entre l'ATPase-Cu⁺ Ccc2p (ATPase de type P_I) et de l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a (ATPase de type P_{II}) est présentée (chapitre 4).

Matériel et Méthodes

M.1. Matériel et méthodes sur Résultat R1

M.1.1 Schéma global



M.1.2 Matériel

Le gène codant pour l'ATPase **CadA_{LM}** nous a été donné par le Dr. Pascale Cossard de l'Institut Pasteur (Paris). Les souches bactériennes utilisées sont des souches d'*Escherichia coli*. JM109 a été utilisée pour les sous-clonages et les amplifications d'ADN. La souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* utilisée est W303-1a (génotype : Mata, ade2-101, his3-11-15, leu2-3-112, trp1-1, ura3-1). Pour son maintien, la souche W303-1a est cultivée sur milieu riche YD (1% Yeast Extract KAT, 2% glucose). Pour la sélection des vecteurs d'expression, on utilise un milieu Drop Out sans uracile (26.7 g/L Drop Out Base + 0.8 g/L Complete Supplement Mixture sans uracile, Qbiogene, Illkirch, France). Les levures sont rendues compétentes selon la méthode de LiAc (Current protocols in molecular biology) qui utilise l'acétate de lithium.

Les enzymes de restriction et de modification proviennent de New England Biolabs ou de Invitrogen. Les plasmides d'amplification, dans lesquels le gène *CADA* a été sous-cloné et sur lesquels les modifications génétiques ont été effectuées, sont pSP72 (Promega, Charbonnières, France) et pBLUESCRIPT SK (-). Les plasmides d'expression du système levurien sont pRS316 et YEp196PALEH. Les techniques de digestion et de modification enzymatiques par les enzymes de restriction et de modification, de précipitation d'ADN, de séparation électrophorétique sur gels d'agarose et de ligation ont été effectuées selon les protocoles standards (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley). Les extractions d'ADN des gels d'agarose ont été réalisées grâce au kit GENE-CLEAN[®] de Q-BIOgene. Les bactéries sont rendues compétentes par la méthode au chlorure de calcium (Current Protocols in Molecular Biology) et leur transformation est effectuée selon les protocoles standards.

M.1.3 CadA_{LM} sauvage

Le fragment HindIII/EcoRI de 2.7 kb du plasmide pMa39 et contenant *CADA* (Lebrun *et coll.*, 1994b) a été cloné dans le plasmide pSP72 et sous cloné dans le plasmide pBLUESCRIPT SK (-). Deux sites de restriction, SacI et BstBI, ont été générés par mutagenèse dirigée (pSPCadA). Le site de restriction SacI, créé à partir de l'amorce 5' GGAGTGGGAGCTCTAATGGCAGAAAAGACTG 3', est localisé 3 paires de base en amont du codon d'initiation **ATG** de *CADA*. Le site de restriction

BstBI, créé à partir de l'amorce 5' GTCTAGTTGGTTTTTCGAATTATTCTGAAAGCATTCC 3', est localisé 26 paires de base en aval du codon stop TAA de *CADA*. Dans le vecteur pSPCadA, le gène *CADA* a été entièrement séquencé puis sous-cloné à l'aide des sites *SacI* et *BstBI* dans le vecteur pBLUESCRIPT SK (-) (Stratagene, Amsterdam, Hollande) pour donner le vecteur pSKCadA.

A partir de pSKCadA, un clonage *EcoRI*/*HinDIII* permet d'insérer *CADA* dans les vecteurs d'expression pour la levure. Deux types de vecteurs d'expression ont été utilisés : le vecteur YEp196PALEH (pY) (dérivé du vecteur YEplac195 (Gietz et Sugino, 1988)) et le vecteur pRS316 (pCEN, (Sikorski et Hieter, 1989)). Tous deux portent le gène de sélection *URA3* qui encode une enzyme de la voie de biosynthèse de l'uracile. pY possède une origine de réplication 2 μ qui lui permet de se répliquer indépendamment du génome levurien. Présent au nombre de 50 à 100 copies par levure, pY est un vecteur multicopie. pCEN contient une origine de réplication CEN/ARS (Centromer/ Autonomously Replicating Sequence) qui lui permet de se répliquer en même temps que le génome levurien. Présent au nombre de 1 à 2 copies par cellule, pCEN est un vecteur monocopie, appelé aussi centromérique.

M.1.4 Les formes de CADA étiquetées

Pour immunodétecter **CadA_{LM}** par Western Blot, nous avons modifié l'extrémité 3' de son gène pour insérer une séquence encodant l'épitope HA, un nanopeptide (**YPYDVPDYA**) issu de l'hémagglutinine du virus de la grippe. Tout d'abord un site de restriction NsiI a été créé par mutagenèse dirigée dans le plasmide pSPCadA au niveau du codon Stop du gène de *CADA* en utilisant l'amorce 5' GAAAGTGAAAGATGCAT TACCGCTATTGTCTAG 3'. Le plasmide nouvellement créé (pSPCadA_{NsiI}) a été digéré par les enzymes *NsiI* et *BstBI* et deux oligonucléotides HA1 (5' TTGTACCCATACGAC GTCCCAGACTACGCTTAATT 3') et HA2 (5' CGAATTAAGCGTAGTCTGGGACGTCG TATGGGTACAATGCA 3'), préalablement hybridés, ont été ajoutés au vecteur ouvert. Ces deux oligonucléotides sont complémentaires dans la région encodant l'épitope HA et la région contenant le codon **Stop** et recréent, aux extrémités 5' et 3', les sites *NsiI* et *BstBI*, respectivement. Dans ce nouveau vecteur, nommé pSPCadAHA, la région

additionnelle a été séquencée pour vérifier l'insertion en phase de la région encodant l'épitope HA. Le gène *CADAH*A a été ensuite sous-cloné à l'aide des sites *SpeI* et *HindIII* dans le vecteur pSKCadA. A partir de pSKCadA, un clonage *EcoRI/HindIII* permet d'insérer *CADAH*A dans pY (pYCadAHA) et pCEN (pCENCadAHA).

Pour localiser **CadA_{LM}** et **D398A** dans la levure, nous avons fusionné leurs gènes avec le gène de la GFP. Pour la construction des vecteurs pCENCadAGFP et pCEND398AGFP, la séquence codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein) a été amplifiée par PCR à partir du vecteur pFA6a-GFPS65T-His3MX6 (Wach *et coll.*, 1997) en utilisant les amorces GFP1 (5'-GGTTCGACGGATCCCCGGGTATGCATACAGTAAA GGAGAAG) et GFP2 (5'-CGCTTATTTAGAAGTGGCATGCCCTATTTGTATAGTTC). Pour des raisons de simplicité, un sous-clonage dans le vecteur pFastBac1, vecteur d'expression destiné au système Baculovirus/Sf9 a été réalisé. Ainsi, le produit de PCR a-t-il été sous-cloné dans les sites *NsiI/SphI* sites des vecteurs pFB-CadAHA ou pFB-D398AHA, en remplacement de la séquence codant pour l'épitope HA, créant ainsi les vecteurs pFBCadAGFP et pFBD398AGFP. Enfin, les séquences codantes pour CadAGFP et D398AGFP ont été insérées dans les sites *EcoRI/HindIII* du vecteur pCENCadA en remplacement de *CADA* créant ainsi les vecteurs pCENCadAGFP et pCEND398AGFP.

M.1.5 Tests phénotypiques

Les transformants levuriens sont cultivés en milieu liquide sélectif pendant 36 heures. La densité cellulaire de chaque culture est estimée par comptage à l'aide d'une cellule de THOMA et des dilutions appropriées en milieu sélectif permettent d'amener toutes les cultures à une même concentration. Des gouttes de 3 µl de chaque culture sont alors déposées sur des boîtes sélectives, avec ou sans métal ajouté, placées ensuite à l'étuve à 30°C pendant 3 jours.

M.1.6 L'extrait membranaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Les levures sont récoltées en phase stationnaire par une centrifugation de 10 min à 7500 g puis lavées deux en eau. Le culot est ensuite remis en suspension dans 15

ml de 50 mM MOPS/Tris (pH 7), 100 mM KCl, 1 mM PMSF, 1 cachet d'antiprotéases/50ml (Roche, Meylan, France) et 20 µg/ml de DNase I. Ce tampon peut contenir 1 mM MgCl₂ selon le type d'expérience réalisée. Quinze ml de billes de verre de diamètre 0.5 mm sont additionnées à la suspension cellulaire. Le broyage est effectué en chambre froide et dans la glace à l'aide du broyeur BeadBeater® (Biospec Product, Bartlesville, USA), selon la séquence 1 min de broyage/1 min de repos, répétée 10 fois. Le broyat est centrifugé 10 min à 450 g pour éliminer les débris cellulaires et les cellules non broyées. Le surnageant est ensuite centrifugé 40 min à 100 000 g pour recueillir dans le culot, la fraction membranaire totale. Ce culot est remis en suspension en 50 mM MOPS/Tris (pH 7), 100 mM KCl, 1 mM PMSF, 1 cachet d'antiprotéases/50 ml, aliquoté, congelé en azote liquide et conservé à -85°C.

M.1.7 Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode DC (Bio-rad, Hercules, CA, USA). Ce dosage est colorimétrique, similaire à la méthode de Lowry, adapté à la détermination de la concentration des protéines après une solubilisation par un détergent (dans notre cas le SDS). Il est ainsi adéquat pour la détermination de la concentration de protéines membranaires. Le dosage est basé sur la réaction des protéines avec une solution alcaline de tartrate de cuivre et le réactif de Folin. Comme dans le cas du dosage par la méthode de Lowry, deux étapes permettent le développement de la coloration : la réaction entre les protéines et le cuivre dans un milieu alcalin, puis la réduction du réactif de Folin par les protéines traitées par le cuivre. La couleur bleue (maximum d'absorption à 750 nm) est due, principalement, aux tyrosines et aux tryptophanes ainsi qu'à un niveau moindre, aux cystéines et aux histidines des protéines.

M.1.8 Gels SDS-PAGE

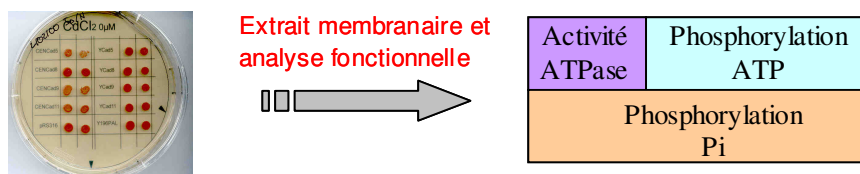
Les protéines quantifiées (50 µg) sont séparées par la méthode SDS-PAGE selon un protocole standard. Les gels utilisés sont composés d'un gel de concentration Tris 0.125 M (pH 6.8) et d'un gel de séparation Tris 0.3 M (pH 8.8) contenant 10 à 12% d'acrylamide. Après migration, les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie.

M.1.9 Immunodétection

Cette technique a été utilisée pour révéler les protéines portant l'épitope HA mais aussi dans l'étude des chimères, pour détecter les fragments d'ATPases hybrides venant de SERCA1a ou de Ccc2p. Après électrophorèse, les protéines sont transférées vers une membrane de nitrocellulose selon les protocoles standards. Pour la détection de l'épitope HA, nous avons utilisé à la dilution 1/1000, un anticorps monoclonal anti-HA sur lequel est greffé une activité peroxydase (anti-HA-Peroxidase, high affinity 3F10, Roche Molecular Biochemicals). Pour la détection de la grande boucle de SERCA1a, nous avons utilisé à la dilution 1/1000, l'anticorps monoclonal MA3-912 (Affinity Bioreagent, USA) révélé dans une seconde étape par un anticorps anti-espèce couplé à la peroxydase. Pour détecter la grande boucle de Ccc2p, nous avons utilisé un anticorps polyclonal à la dilution 1/5000 produit par la société Neosystem (Lowe *et coll.*, 2004) et révélé comme l'anticorps anti-SERCA1a. L'activité peroxydase est détectée par chimiluminescence grâce au Kit BM Chemiluminescence Western Blotting (Boehringer Mannheim).

M.2. Matériel et méthodes sur Résultat R2

M.2.1 Schéma global



M.2.2 Mesures de phosphorylation par l'ATP

La formation d'intermédiaires phosphorylés à partir d'ATP est effectuée à 25°C, en incubant 50 µg de protéines totales dans 100 µl de 5 mM MOPS-Tris (pH 7), 100 mM KCl, 300 mM saccharose, en présence d'un métal (CdCl₂, ZnCl₂, NiCl₂, CuCl₂, CoCl₂, CaCl₂, FeCl₃, MnCl₂, HgCl₂, Pb(CH₃COO)₂).

La réaction de phosphorylation est initiée par l'ajout de 1 μM [γ - ^{32}P]ATP et arrêtée 15 s plus tard par addition de 1 ml de tampon d'arrêt (7% (v/v) acide trichloracétique, 1 mM KH_2PO_4) préalablement refroidi dans la glace. Après 30 à 45 min d'incubation dans la glace, les protéines précipitées sont récoltées par centrifugation (15 min, à 15000 g, 4°C), lavées trois fois dans le tampon d'arrêt, suspendues dans 40 μl de tampon de suspension (18 mM lithium dodécyl sulfate, 0.1 mM SDS, 2.5 mM NaH_2PO_4 -NaOH, pH 6, 1 % (v/v) β -mercaptoéthanol, 0.25 mg/ml bleu de bromophénol et 50 % glycérol) et analysées par migration électrophorétique sur un gel de polyacrylamide en condition acide (Weber et Osborn, 1969). L'utilisation de ces conditions acides permet d'éviter une hydrolyse de la liaison aspartyl-phosphate. Le gel est exposé sur un écran PhosphorScreen et analysé à l'aide d'un Phosphorimager (Molecular Dynamics Amersham Pharmacia Biotech). Le gel est ensuite immunodéecté par Western Blot pour estimer la quantité de protéines chargée et la taille des bandes phosphorylées.

Dans les expériences de cinétique ou de dilution isotopique, la réaction est réalisée dans un volume de 100 μl et aux temps ou à la concentration d'ATP froid indiqués. Les échantillons sont arrêtés en ajoutant 1 ml de tampon d'arrêt. Les étapes suivantes sont identiques à celles décrites plus haut.

M.2.3. Mesures de phosphorylation par le phosphate inorganique

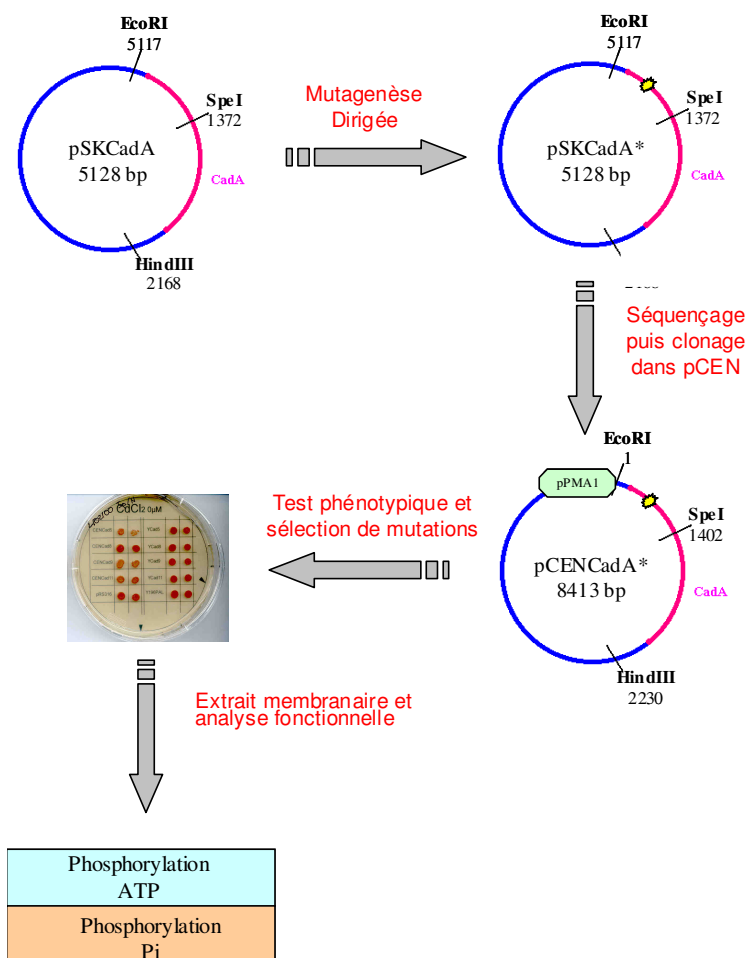
La formation d'intermédiaires phosphorylés à partir de phosphate inorganique est effectuée à 25°C. Les échantillons (50 μg) sont incubés 10 min dans 100 μl de 50 mM MES-Tris (pH 6), 0 à 10 mM MgCl_2 , 40 % (v/v) diméthyl sulfoxyde, en présence de 0 à 10 μM de CdCl_2 . La phosphorylation est initiée par addition de 100 μM ^{32}Pi . Après 10 min à 25°C, la réaction est arrêtée par ajout de 1 ml du même tampon d'arrêt que précédemment. Les étapes suivantes sont les mêmes que celles décrites pour la phosphorylation par l'ATP.

M.2.4 Mesures d'activité ATPase

Les échantillons sont préparés comme décrit M.2.3. La réaction de phosphorylation est initiée par l'ajout de 100 μM [γ - ^{32}P]ATP et arrêtée de 15 s à 5 min plus tard par addition de 1 ml de charbon activé par 0.1N HCl. La radioactivité du phosphate libéré par la réaction est ensuite mesurée par scintillation dans 20 μl de suspension. Le phosphate libéré par hydrolyse spontanée de l'ATP est mesuré en répétant l'expérience en absence de protéine. Il est ensuite soustrait des mesures.

M.3. Matériel et méthodes sur Résultat R3

M.3.1 Schéma global



M.3.2 Mutagenèse dirigée par PCR

La technique de mutagenèse dirigée *in vitro* par PCR permet de créer des mutations ponctuelles localisées dans un gène. Cette manipulation est réalisée grâce au kit Quick-Change™ Site-directed Mutagenesis (Stratagene) basé sur l'amplification d'un plasmide, contenant l'insert à muter, par des amorces possédant la mutation désirée, grâce à l'ADN polymérase *Pfu turbo* (Figure M.1).

QuickChange™ 1-Day Site-Directed Mutagenesis Method

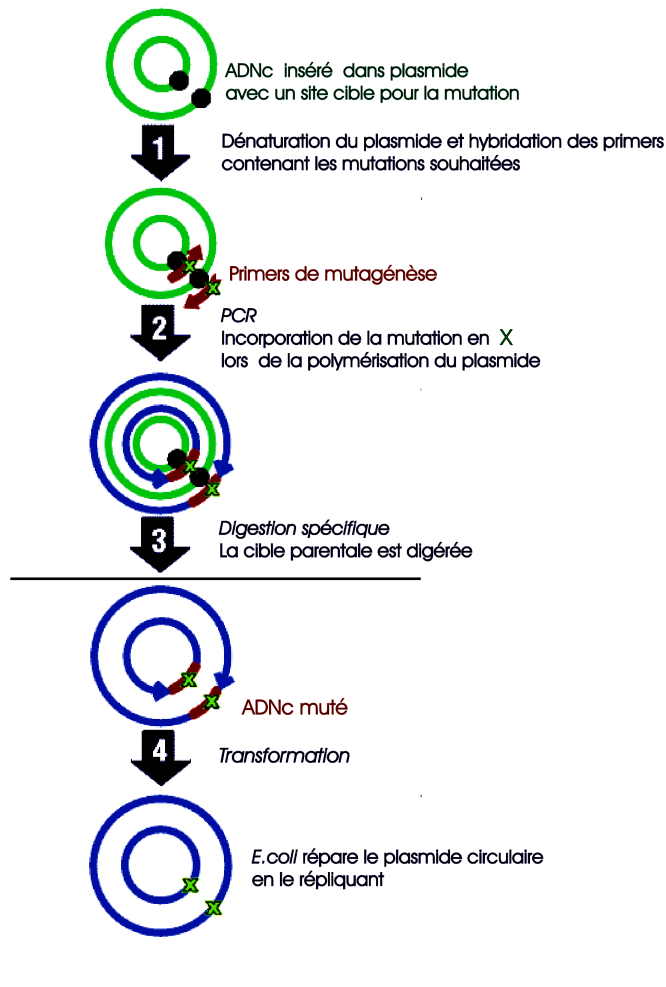


Figure M1 : Description des étapes de la mutagenèse dirigée

Le plasmide est dénaturé à 95°C dans la première étape de PCR. Les oligonucléotides de synthèse, de trente nucléotides en moyenne et portant la mutation, s'hybrident avec le plasmide. Le premier cycle d'élongation de la PCR génère un nouveau plasmide muté qui sera amplifié par les amorces lors des cycles suivants. Le produit de PCR est constitué majoritairement, après 18 à 20 cycles, par des plasmides ayant incorporés la mutation. Pour augmenter encore l'efficacité de la mutagenèse, les plasmides parentaux originellement méthylés sont digérés par l'enzyme de restriction DpnI. Le produit de PCR, après l'étape de digestion par DpnI, est amplifié dans les bactéries XL1-Blue puis analysé par digestion enzymatique. Toute mutation créée est vérifiée par séquençage. Les étapes suivantes sont identiques à celles décrites plus haut.

M.4. Matériel et méthodes sur Résultat R4

M.4.1 Schéma global - Voir les figures R12 et R16

M.4.2 Grand domaine cytoplasmique de CadA_{LM}, Ccc2 et Serca1a

Pour **CadA_{LM}**, le grand domaine cytoplasmique est délimité de DKTGTLT à AMVGDGIND

Pour Ccc2, le grand domaine cytoplasmique est délimité de DKTGTLT à AVVGDGIND

Pour Serca1a, le grand domaine cytoplasmique est délimité de DKTGTLT à AMTGDGVND

M.4.3 Domaine nucléotidique de CadA_{LM}, Ccc2 et Serca1a

Pour **CadA_{LM}**, le domaine nucléotidique est délimité de DKTGTLT à MLTGDN

Pour Ccc2, le domaine nucléotidique est délimité de DKTGTLT à MITGDN

Pour Serca1a, le domaine nucléotidique est délimité de DKTGTLT à MITGDN

M.4.4 Domaine de phosphorylation de CadA_{LM}, Ccc2 et Serca1a

Pour **CadA_{LM}**, le domaine de phosphorylation est délimité de MLTGDN à AMVGDGIND

Pour Ccc2, le domaine de phosphorylation est délimité de MITGDN à AVVGDGIND

Pour Serca1a, le domaine de phosphorylation est délimité de MITGDN à AMTGDGVND

Résultats

R.1 Expression de CadA_{LM} et de ses variants dans *Saccharomyces cerevisiae*

Les résultats de ce chapitre ont été publiés dans l'article joint à la fin du chapitre. Dans le texte qui suit, les figures de l'article sont signalées par la notation a1;Fig.n.

*Par ailleurs, une partie du travail concernant l'expression et la caractérisation de CadA_{LM} dans la levure *S. cerevisiae* est décrite dans la thèse de Nathalie Bal (Bal, 13 décembre 2002). Je m'efforcerai d'en faire la synthèse dans les premiers paragraphes de ce chapitre.*

De nombreux exemples indiquent que *S. cerevisiae* peut être un système efficace de surproduction d'ATPases de type P. C'est ainsi que des ATPases de quasiment toutes les spécificités ioniques (H^+ , Ca^{2+} , Na^+/K^+ , H^+/K^+ , Cu^+ ou Cd^{2+}) issues aussi bien d'organismes eucaryotes que procaryotes, ont été produites dans la levure. On retiendra à titre d'exemples, les ATPases- H^+ de *S. cerevisiae* (Supply *et coll.*, 1993), de plantes (Villalba *et coll.*, 1992; Palmgren et Christensen, 1994; Morsomme *et coll.*, 1996) et de *Neurospora crassa* (Mahanty *et coll.*, 1994), l'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a (Centeno *et coll.*, 1994; Lenoir *et coll.*, 2002), ainsi que les ATPases- Cu^+ de Menkes (Payne et Gitlin, 1998; Voskoboinik *et coll.*, 2001) et de Wilson (Hung *et coll.*, 1997; Iida *et coll.*, 1998).

Parallèlement aux tentatives de production dans le système baculovirus/Sf9 et le système bactérien, nous avons voulu évaluer la capacité de la levure *S. cerevisiae* à produire **CadA_{LM}** sauvage ou mutée.

Il convient de rappeler ici quelques informations importantes concernant l'effet d'une surexpression ou d'une délétion du gène *CADA_{LM}*. Dans les organismes procaryotes, la présence de gènes de type *CADA* est associée à une résistance au cadmium.

Ainsi, chez *Listeria monocytogenes*, lorsque le gène *CADA_{LM}* est absent, la cellule devient très sensible au cadmium, la concentration minimale inhibitrice (CMI) ou concentration de métal induisant un arrêt de la croissance, diminuant de 512 μM à 16 μM (Lebrun *et coll.*, 1994b). On observe le même phénomène chez *Staphylococcus aureus*, pour la délétion du gène codant pour l'ATPase **CadA_{SA}** (Perry et Silver, 1982). Venant corroborer les conclusions des expériences de délétions, l'introduction du gène *CADA_{LM}* chez *Bacillus subtilis* est associée à une augmentation de la tolérance au cadmium: la CMI de cadmium passe de 8 μM à 256 μM (Lebrun *et coll.*, 1994b).

Les exemples que nous venons de citer concernent des effets observés chez des organismes procaryotes. Qu'en sera-t-il lorsque **CadA_{LM}** sera produite dans la levure *S. cerevisiae* ?

R1.1 Augmentation de la sensibilité au cadmium de S. cerevisiae induite par CadA_{LM}

Tout au long de ce chapitre, les résultats obtenus pour **CadA_{LM}** seront confrontés à ceux obtenus pour le mutant **D398A**. D398 est l'acide aminé phosphorylé au cours du cycle catalytique de **CadA_{LM}**; il appartient à la séquence consensus DKTGT (Figure I.2) et sa mutation en alanine inactive la protéine.

On parlera aussi au cours de ce chapitre d'un vecteur centromérique, pRS316 (ou CEN dans l'article 1). Il s'agit d'un vecteur d'expression spécifique de la levure dont le nombre de copies dans la cellule n'excède pas 2. Dans ce vecteur, le gène codant pour **CadA_{LM}** est sous la dépendance du promoteur constitutif fort de l'ATPase-H⁺ Pma1p.

Tel qu'on peut le voir dans la figure a1;Fig.1B, une souche de levure (en l'occurrence la souche W303-1A) transformée par le vecteur centromérique (pRS316) contenant *CADA_{LM}* sauvage est incapable de croître sur un milieu contenant plus de 1 μM de Cd^{2+} . Dans les mêmes conditions de croissance, la même souche transformée par le vecteur pRS316 vide ou le vecteur pRS316 contenant le gène *CADA_{LM}* muté, peut croître jusqu'à 100 μM de Cd^{2+} . On notera qu'en absence de Cd^{2+} , les trois types de transformants ont des croissances comparables (a1;Table 1).

Ainsi, contrairement au phénotype observé lors de la surexpression de **CadA_{LM}** dans *B. subtilis*, l'expression de **CadA_{LM}** dans la levure induit une sensibilité au cadmium conduisant à un phénotype de mortalité dès 1 μM de ce métal. La levure exprimant **CadA_{LM}** présente une sensibilité au moins 100 fois plus élevée au Cd^{2+} que la cellule qui n'exprime pas **CadA_{LM}** ou qui exprime une protéine inactive.

R.1.2 Le phénotype de la levure exprimant CadA_{LM} n'est pas reproduit par des levures exprimant d'autres ATPases de type P.

Afin d'attribuer sans ambiguïté à **CadA_{LM}** le phénotype observé, nous avons exprimé dans la même souche W303-1A, d'autres ATPases de type P mais de spécificités ioniques différentes. La figure a1;Fig.1C montre que la présence d'une ATPase- Ca^{2+} (en l'occurrence SERCA1a, une ATPase de type P_{II}), ou d'une ATPase- Cu^{+} (en l'occurrence Ccc2p de *S. cerevisiae*, une ATPase de type P_I comme **CadA_{LM}**) n'induisent pas de sensibilité au cadmium.

Deux précisions méritent d'être apportées pour dissiper tout doute concernant cette expérience.

On remarquera que les ATPases- Ca^{2+} et Cu^{+} sont produites non pas à partir du vecteur centromérique pRS316 utilisé jusqu'à présent pour exprimer **CadA_{LM}** mais à partir d'un vecteur appelé 2 μ . Il s'agit d'un vecteur comparable au vecteur pRS316 mais dont le nombre de copies dans la cellule est plus élevé (2 à 50). Ce changement quantitatif n'affecte pas le phénotype de sensibilité au cadmium induit

par **CadA_{LM}**. Comme le montre la Figure R1, l'inhibition de croissance induite par **CadA_{LM}** en présence de cadmium survient à une concentration de 1 μM de Cd^{2+} , comme dans le cas du vecteur pRS316 (a1;Fig.1B).

On pourrait objecter que les ATPases- Ca^{2+} et Cu^+ ne sont pas fonctionnelles dans la levure. Concernant l'ATPase- Ca^{2+} , il a été montré par une expérience d'accumulation de calcium sur cellules entières, que la protéine est fonctionnelle (Degand *et coll.*, 1999). Concernant l'ATPase- Cu^+ , une expérience de complémentation fonctionnelle montre que la protéine exprimée est active (Lowe *et coll.*, 2004).

Nous pouvons donc conclure que c'est bien **CadA_{LM}** fonctionnelle, et uniquement elle, qui confère à la levure le phénotype d'hyper-sensibilité au cadmium.

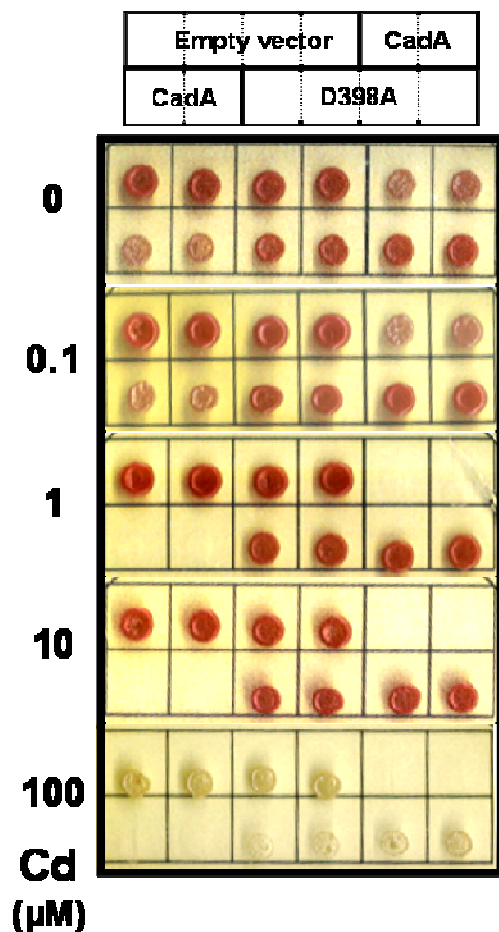


Figure R1
Phénotypes induits à
partir de vecteurs 2 μ

R.1.3 Effets des métaux

La famille des ATPases de type P1 à laquelle appartient **CadA_{LM}** a été divisée sur la base d'homologie de séquences et de données fonctionnelles, en deux sous-familles: les ATPase-Cu⁺ ou Ag⁺ et les ATPases-Cd²⁺, Zn²⁺ ou Pb²⁺ (Rensing *et coll.*, 1999; Borremans *et coll.*, 2001). Différents travaux déjà mentionnés comportant des suppressions ou des surexpressions, ainsi que nos travaux de caractérisation fonctionnelle (Bal, 13 décembre 2002) attestent de l'appartenance de **CadA_{LM}** à cette deuxième sous-famille. Nous avons donc naturellement cherché à savoir si l'expression de **CadA_{LM}** dans la levure modifiait la sensibilité au zinc et au plomb mais aussi à toute une série d'autres métaux.

La figure a1;Fig.3A montre la croissance sur milieux solides contenant 10 µM de CdCl₂, Zn(CH₃COO)₂, Pb(CH₃COO)₂, CoCl₂, CuSO₄, NiCl₂, FeCl₃ ou CaCl₂, d'une souche W303-1a contenant soit le vecteur vide pRS316 (ou CEN), soit le vecteur exprimant le mutant non-fonctionnel (CEN-D398A), soit le vecteur exprimant **CADA_{LM}** (CEN-CadA). On constatera que les cellules possédant le vecteur centromérique (pRS316) et celles contenant **D398A** s'accommodent très bien de 10 µM de chacun des ions métalliques testés. C'est le cas aussi pour les cellules contenant **CadA_{LM}**, sauf bien sûr pour le cadmium. En d'autres termes, seul le cadmium induit un phénotype de létalité dépendant de la présence de **CadA_{LM}**.

R.1.4 CadA_{LM} produite dans la levure est fonctionnelle

L'analyse par gels SDS-PAGE d'extraits membranaires de levures contenant **CEN-CadA_{LM}** ou **CEN-D398A** ne nous a pas permis pas de déceler après coloration au bleu de Coomassie, une protéine supplémentaire de la taille attendue pour **CadA_{LM}**: le taux d'expression de la protéine est donc très faible. A titre de comparaison, le même type d'analyse permet de détecter la présence de **CadA_{LM}** dans des extraits membranaires de cellules Sf9 transfectées par un baculovirus

contenant le gène *CAD_{LM}* (Bal *et coll.*, 2001). Afin de nous assurer de la présence de **Cad_{LM}** dans la levure et ne disposant pas d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine, nous avons étiqueté **Cad_{LM}** et le mutant **D398A** à l'aide d'un épitope HA situé à l'extrémité C-terminale des deux protéines. L'analyse par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-HA couplé à la peroxydase montre un signal au niveau des poids moléculaires attendus pour **Cad_{LM}** et **D398A** (a1;Fig.4A). Les deux protéines sont bien présentes dans la levure et en quantités comparables. Des bandes faiblement visibles, localisées en dessous de **Cad_{LM}** et **D398A**, indiquent une légère protéolyse au cours de sa préparation.

La seule détection de **Cad_{LM}** ne donne aucune information quant à sa fonctionnalité. C'est la raison pour laquelle nous avons réalisés sur différents extraits membranaires, des expériences de phosphorylation. Comme le montre la Figure a1;Fig4B, la protéine **Cad_{LM}** exprimée dans la levure peut être phosphorylée par l'ATP en présence de cadmium, attestant ainsi de sa fonctionnalité.

R.1.5 Localisation intracellulaire de Cad_{LM}

L'hypersensibilité au cadmium qu'induit l'expression de **Cad_{LM}** dans la levure est contradictoire avec les résultats obtenus dans *L. monocytogenes*, organisme d'origine de **Cad_{LM}** dans lequel la protéine assure la résistance de la bactérie au cadmium. Ces résultats opposés sont révélateurs des caractéristiques propres de chacun des organismes dans lesquels ils ont été observés. Pour expliquer cette inversion de sensibilité (ou de résistance) au cadmium entre le procaryote *L. monocytogenes* et l'eucaryote *S. cerevisiae* en présence de **Cad_{LM}**, il est essentiel de rechercher la localisation de **Cad_{LM}** dans ces deux organismes. Le cytoplasme de *L. monocytogenes* est dépourvu de structures membranaires, donc **Cad_{LM}** se trouve évidemment dans la membrane cytoplasmique. Son site catalytique est nécessairement dans le cytoplasme, là où elle puise l'énergie fournie par l'ATP qui assure le transport du cadmium. Enfin, la résistance de *L. monocytogenes* au cadmium s'explique par le rejet du cadmium hors de la cellule. Dans *S. cerevisiae*, il est difficile compte tenu de la présence de multiples organites, de prédire la localisation intracellulaire de **Cad_{LM}**. Pour tenter de les localiser dans la levure,

CadA_{LM} et **D398A** ont été fusionnés à la GFP (Green Fluorescent Protein) puis détectés dans la cellule par microscopie confocale et microscopie de fluorescence. Comme le montre la Figure a1;Fig5, le signal GFP prend l'apparence d'un anneau entourant le noyau dans les cellules isolées ou suit la division nucléaire dans les cellules en bourgeonnement. Cette localisation périnucléaire, déjà observée lors de la surexpression d'ATPases de type P, comme les ATPases-H⁺ Pma2 de *Nicotiana plumbaginifolia* (de Kerchove d'Exaerde *et coll.*, 1995) et Pma2p de *S. cerevisiae* (Supply *et coll.*, 1993), a été aussi mise en évidence avec **CadA_{LM}** fusionnée à l'épitope HA, détecté par un anticorps anti-HA conjugué à la fluorescéine. Enfin, des observations en microscopie électronique réalisées à Bordeaux en collaboration avec Bénédicte Salin ont permis de détecter dans une souche exprimant **D398A-HA**, des structures membranaires régulières bordant le noyau (Figure R2) qui pourraient s'apparenter à des structures déjà observées dans le cas de surexpression d'ATPases de type P dans la levure (de Kerchove d'Exaerde *et coll.*, 1995).

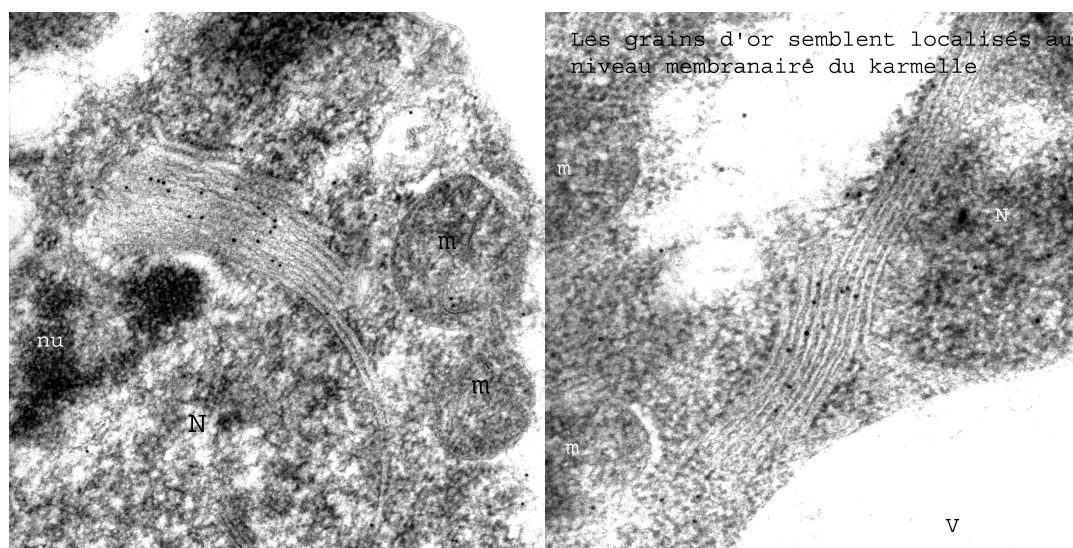


Figure R2 : Photographie de microscopie électronique montrant la localisation de **D398AHA**. La protéine (petit points noirs) est détectée à l'aide d'un anticorps anti-HA et d'un second anticorps anti-espèce couplé à l'or. N : noyau, nu :

R.1.6 Comment CadA_{LM} empoisonne-t-elle la levure ?

Les résultats exposés précédemment montrent sans ambiguïté que l'ATPase-Cd²⁺ de *L. monocytogenes* est fonctionnelle dans la levure. Sa localisation suggère par ailleurs que la sensibilité au cadmium de la cellule a pour cause première l'accumulation de ce métal dans le réticulum endoplasmique. A titre de comparaison, les proliférations membranaires périnucléaires produites lors de l'expression de l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a dans la levure sont capables d'accumuler du calcium (Degand *et coll.*, 1999).

Nous disposons de peu d'informations sur les voies d'entrée du Cd²⁺ dans la cellule. Récemment, il a été suggéré que la voie principale de pénétration du Cd²⁺ dans la levure était le transporteur de zinc, Zrt1p. On s'attendrait dans ce cas à ce que le zinc diminue la sensibilité au cadmium, non seulement par compétition directe avec le cadmium au niveau du transporteur Zrt1p mais aussi parce que le zinc lui-même régule négativement au niveau post-traductionnel et transcriptionnel, la quantité de transporteurs présents dans la membrane plasmique. Il n'en est rien, comme le montre la Figure a1;Fig3B : 1 mM de zinc n'affecte que très peu la sensibilité à 1 µM de Cd²⁺. Il se pourrait que d'autres transporteurs passifs tels que Fet4p (Dix *et coll.*, 1994) ou Smf1p, transporteur homologue à Nramp (Supek *et coll.*, 1996; Supek *et coll.*, 1997; Liu *et coll.*, 1997) permettent l'entrée effective de Cd²⁺ dans la cellule.

Il est difficile de savoir pourquoi les systèmes d'efflux du Cd²⁺ recensés dans la levure ne parviennent pas à protéger la cellule exprimant **CadA_{LM}** de la toxicité du Cd²⁺. Ces systèmes d'efflux sont d'une part l'ATPase de type P_i Cad2p (Shiraishi *et coll.*, 2000) et d'autre part, deux transporteurs vacuolaires de la famille des transporteurs ABC, Ycf1p (Szczypka *et coll.*, 1994) et Bpt1p (Klein *et coll.*, 2002). Concernant Cad2p et compte tenu de son polymorphisme, il se pourrait que le gène soit tout simplement absent de la souche W303-1a. Concernant les transporteurs ABC, il se pourrait comme nous le suggérons dans l'article a1, que leur activité ne

soit effective qu'à des concentrations de Cd^{2+} intracellulaires plus élevées que celles auxquelles répond **CadA_{LM}**.

L'accumulation de Cd^{2+} dans le réticulum endoplasmique va sans nul doute affecter le protéome de la levure. Il est cependant intéressant de noter comme nous le montrons dans la figure a1;Fig2 que l'un des effets précoces du Cd^{2+} sur la cellule contenant **CadA_{LM}** est la perte du vecteur d'expression. On peut peut-être et avec beaucoup de précautions, rapprocher ce phénomène de la fragmentation de l'ADN induite par le Cd^{2+} chez certaines cellules animales, phénomène qui participe du processus d'apoptose.

A cloned prokaryotic Cd^{2+} P-type ATPase increases yeast sensitivity to Cd^{2+}

Chen-Chou Wu^a, Nathalie Bal^a, Julien Perard^a, Jennifer Lowe^b, Cécile Boscheron^c,
Elisabeth Mintz^a, Patrice Catty^{a,*}

^a Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, UMR 5090 CEA-CNRS, Université Joseph Fourier, CEA/DRDC/BMC,
17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France

^b Laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón-Voloch, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro 21941-902, Brazil

^c Laboratoire du Cytosquelette, INSERM U366, CEA/DRDC/BMC, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France

Received 22 September 2004

Abstract

CadA, the P1-type ATPase involved in *Listeria monocytogenes* resistance to Cd^{2+} , was expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and did just the opposite to what was expected, as it strikingly decreased the Cd^{2+} tolerance of these cells. Yeast cells expressing the non-functional mutant Asp³⁹⁸Ala could grow on selective medium containing up to 100 μM Cd^{2+} , whereas those expressing the functional protein could not grow in the presence of 1 μM Cd^{2+} . The CadA-GFP fusion protein was localized in the endoplasmic reticulum membrane, suggesting that yeast hyper-sensitivity was due to Cd^{2+} accumulation in the reticulum lumen. CadA is also known to transport Zn^{2+} , but Zn^{2+} did not protect the cells against Cd^{2+} poisoning. In the presence of 10 μM Cd^{2+} , transformed yeasts survived by rapid loss of their expression vector.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: CadA; Cadmium; Yeast; Toxicity; Endoplasmic reticulum; P1-type ATPase; Detoxification

Cadmium, a non-essential heavy metal widespread in the biosphere, is known as an important environmental hazard and a potent human carcinogen [1]. In microbes, it has been shown that the main Cd^{2+} detoxification pathway is the export of metal out of the cell, an export mediated by three distinct families of proteins: resistance-nodulation-cell division (RND) proteins, cation diffusion facilitator (CDF) proteins, and P1-type ATPases [2]. The latter are membrane proteins involved in the transport of a variety of soft metal ions against their electrochemical gradient. During their catalytic cycle, P1-type ATPases hydrolyze ATP and are transiently phosphorylated on an aspartate residue that be-

longs to the consensus sequence DKTGT. $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ -ATPases constitute a bacterial subfamily of P1-type ATPases that behave as detoxification pumps [2], among which is found CadA, the Cd^{2+} -ATPase from *Listeria monocytogenes* [3,4].

Saccharomyces cerevisiae has two P1-type ATPases, the Cu^{+} -ATPase Ccc2p [5] and a putative Cd^{2+} -ATPase Cad2p [6]. It has been recently used as a model to study cell response to Cd^{2+} at the transcriptome and proteome levels [7,8]. These studies evidenced adaptation of *S. cerevisiae* to Cd^{2+} stress by increased glutathione (GSH) synthesis, leading to massive cytoplasmic sequestration of Cd^{2+} in a (GS)₂Cd complex, the latter being transported into the vacuole by Ycf1p, an ABC transporter [9]. This detoxification pathway has been used recently to determine ionic selectivity of P1-type ATPases expressed in wild type or *yef1-Δ* yeast strain [10–12]. In

* Corresponding author. Fax: +33 4 38 78 54 87.

E-mail addresses: catty@cea.fr, Catty@dsvgre.cea.fr (P. Catty).

addition, *S. cerevisiae* is known to be an efficient system to express P-type ATPases from various organisms.

Our interest for the mechanism of Cd^{2+} transport by CadA [4,13] has led us to work out a phenotypic test allowing to analyze CadA functionality. To avoid *L. monocytogenes* pathogenicity, we chose yeast to express CadA, expecting the functional protein to increase yeast resistance to Cd^{2+} , as recently reported for other P1-type ATPases [10–12]. Unexpectedly, expression of CadA in a wild type yeast strongly increased Cd^{2+} toxicity and we show here that this is due to insertion of CadA in the endoplasmic reticulum membrane.

Materials and methods

Strain and media. For maintenance, the W303-1A strain [14] was grown at 30 °C under continuous stirring at 200 rpm in rich YD medium (1% KAT yeast extract, 2% glucose). Plasmid selection was performed by growing cells in synthetic minimal DOB medium (2% glucose, 0.17% yeast nitrogen base without amino acids, and 0.5% ammonium sulfate, Q-Biogene) supplemented with dropout powder without uracil (CSM-URA, Q-Biogene). Cells were transformed as described in [15]. Unless other specified, metals were added as chloride salts.

Molecular biology. The centromeric vector denoted CEN is derived from pRS316 [16] and the multicopy vector denoted 2 μ is derived from YepLac195 [17]. The expressed gene is located between the yeast constitutive and strong *PMAl* promoter and the yeast *ADHI* terminator. CEN-CadA refers to the centromeric vector with the wild type *CAD*A gene. CEN-D398A refers to the vector with a non-phosphorylatable CadA mutant in which the aspartate from the DKTGT sequence has been changed to an alanine. The genes have been further modified in their 3' ends by fusion to either a hemagglutinin (HA) encoding sequence (CEN-CadA- and CEN-D398A-HA) or a green fluorescent protein (GFP) encoding sequence (CEN-CadA-GFP and CEN-D398A-GFP). Vectors were purified by the MidiPrep method (Qiagen). Sequencing of the different variants of CadA was performed by Génome Express (France).

Expression level analysis. Yeast protein extracts were performed as described in [18]. Proteins were immunodetected after transfer to nitrocellulose membrane using the monoclonal 3F10 anti-HA-peroxidase antibody (Roche) at a 1/1000 dilution. Immunodetection was carried out using the BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (Roche).

Yeast membrane preparation. After a 24 h growth in selective medium supplemented with 0.4 mM EGTA, cells were spun down for 10 min at 1000g and 4 °C, and washed twice with ice-cold water. They were then suspended in buffer A (50 mM Mops-Tris, pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , and 300 mM sucrose) supplemented with anti-proteases (one tablet of complete EDTA-free (Roche) and 1 mM PMSF). After disruption with glass beads, the lysate was centrifuged for 10 min at 1000g and 4 °C to pellet cell debris and nuclei. The resulting supernatant was spun down for 40 min at 100,000g and 4 °C, and the total membrane fraction was suspended in buffer A, aliquoted, and quickly frozen in liquid nitrogen for storage at –85 °C. Protein concentration was determined using the DC protein assay (Bio-Rad).

Phosphorylation from ATP. Phosphorylation was performed as described in [4].

Phenotypic assays. Cells containing CEN, CEN-CadA, or CEN-D398A were grown at 30 °C for 24 h in selective medium. One milliliter was taken to inoculate a 50 ml culture. After an overnight growth, cultures were all brought to the same concentration by dilution before performing drop tests or zone inhibition assays as described in the figures legends.

Microscopy. Yeast cells were analyzed by confocal laser scanning microscopy, using a Leica TCS-SP2 operating system. GFP was excited using the 488 nm line of an argon laser and fluorescence was collected from 500 to 535 nm. For nuclei detection by Hoechst staining, cells collected in the mid-log phase were washed in water and suspended in PBS. Latex beads of 6 μm in diameter (10% v/v, Polysciences) and Hoechst dye 33342 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were then added to the cellular suspension. Cells were observed using a Zeiss Axioscope microscope with chroma, long-pass filters. GFP and Hoechst were excited at 490 and 365 nm, respectively, and their fluorescence was collected at 525 and 480 nm, respectively.

Induced coupled plasma experiments. Freshly grown cells at 30×10^6 cells/ml were washed twice in water and suspended in DOB medium. Incubation in 10 μM Cd^{2+} was performed at 30 °C under continuous stirring (200 rpm). For analysis, cells were spun down and washed first in 1 mM EGTA and second in deionized water. Pellets were dried for 48 h at 50 °C and mineralized. Metal content was determined by induced coupled plasma (ICP) method (ICP-OES Vista MPX, Varian).

Results

To analyze the functionality of CadA, the Cd^{2+} -ATPase from *L. monocytogenes*, the wild type protein, and its non-functional D398A mutant were expressed in *S. cerevisiae*. Their expression, as well as that of their variants modified by C-terminal fusions with HA or GFP, was carried out with a 2 μ expression vector or with CEN, a centromeric vector usually present at 1 or 2 copies per cell [19]. This vector bears the selectivity gene *URA3* and the strong and constitutive yeast *PMAl* promoter controlling the foreign gene.

In the presence of cadmium, CadA induces cell growth arrest

Analysis on solid media

As shown in Fig. 1A by a zone inhibition assay, yeast cells were much more sensitive to Cd^{2+} when they expressed CadA than when they expressed the non-functional mutant D398A. Expression of D398A did not change sensitivity to Cd^{2+} as compared to that of the yeast transformed with the empty vector (see Fig. 1B), confirming that the sensitivity was induced by the functional protein. Drop tests allowed determination of a minimal inhibitory concentration (MIC) of about 1 μM for the cells expressing CadA, whereas the MIC was slightly above 100 μM for the cells expressing D398A or containing the empty vector (Fig. 1B). The same phenotype was observed with 2 μ vectors (Fig. 1C) and with CEN-CadA-HA and -GFP, as well as with YPH500 α , another strain (data not shown). The phenotype appeared related to the ionic specificity of the expressed ATPase since other ATPases such as the sarcoplasmic *Ser*ca1a Ca^{2+} -ATPase [20] or *Ccc*2p, the Cu^{+} -ATPase [21], known to be both active in yeast, did not increase yeast sensitivity to Cd^{2+} (Fig. 1C).

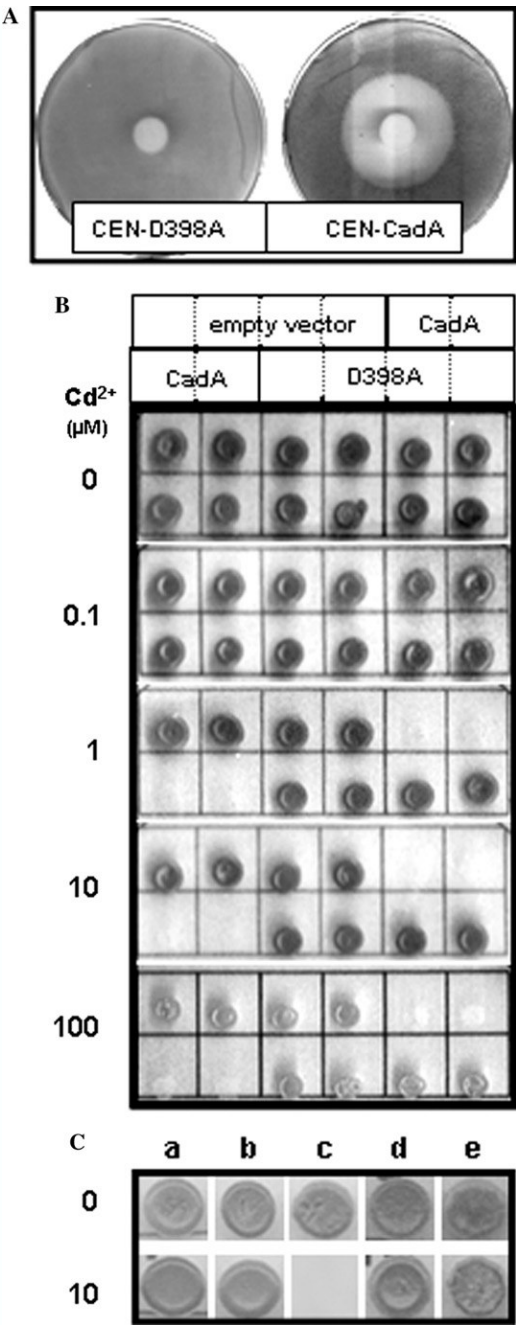


Fig. 1. Cd²⁺-dependent phenotype. (A) Zone inhibition assay: 1 ml of culture was spread onto solid selective medium. Once the sample was completely absorbed by the medium, a Whatman disk (1.4 cm diameter) previously immersed in 100 μM Cd²⁺ was placed at the center of the plate which was further incubated for three days at 30 °C. (B) Drop tests: 3 μl of culture was deposited on solid selective media containing Cd²⁺ as indicated. Four independent clones containing centromeric vectors were distributed as indicated on top. (C) Drop tests were performed as described in (B) with 2 μ vectors: (a) empty 2μ, (b) D398A, (c) CadA, (d) Serca1a, and (e) Ccc2p.

Analysis through liquid cultures

As shown in Table 1, results of the liquid tests confirmed those obtained on solid media. In a medium containing 1 μM Cd²⁺, the cells expressing D398A grew

Table 1
Doubling times of yeasts expressing CadA-HA or D398-HA under different growth conditions

[Cd ²⁺] (μM)	CEN	CEN-CadA-HA	CEN-D398A-HA
0	1.9 ± 0.3	2.0 ± 0.3	2.1 ± 0.3
1	ND	^a	2.4 ± 0.4
10	ND	No growth	3.1 ± 0.5

W303-1A transformants were grown for 24 h in 3 ml of selective medium. One milliliter of culture was added to 25 ml of selective medium incubated at 30 °C. Cell density was then measured every 3 h for 12 h by counting of colony forming units (CFU). Ten microliters of the culture was diluted 10⁴–10⁵ times in YD and 900 μl of the diluted sample was spread onto YD solid medium. After three days at 30 °C, colonies were manually counted. Doubling time is given in hour.

^a In the presence of 1 μM Cd²⁺, cells containing CEN-CadA-HA progressively stopped growing.

normally, whereas those expressing CadA stopped growing. In a medium containing 10 μM Cd²⁺, cells expressing D398A grew more slowly than with 1 μM Cd²⁺, reflecting the intrinsic sensitivity of the yeast strain to Cd²⁺, whereas the cells expressing CadA were unable to grow. Microscopic observations of cells expressing CadA and grown in 10 μM Cd²⁺ showed small and slightly deformed cells with dense interior, whether they were budding or not. The proportion of these abnormal cells increased with incubation time.

Cells expressing CadA rapidly lose the expression vector when exposed to Cd²⁺

The CFU counting method employed here to quantify the effect of Cd²⁺ on cellular growth revealed that even after a long incubation in 10 μM Cd²⁺ (up to 21 h), cells expressing CadA could grow when plated on non-selective medium (Fig. 2, compare pictures 4 and 5). Therefore, although Cd²⁺ induced growth arrest, cells were still alive after 21 h. To test whether Cd²⁺-dependent growth arrest was associated to genotypic changes, we replicated cells on a selective medium lacking uracil. We observed that whereas cells expressing D398A (Fig. 2, pictures 9 and 12) and cells expressing CadA and grown in the absence of Cd²⁺ (Fig. 2, picture 3) displayed the expected ura⁺ phenotype, cells expressing CadA and previously grown in 10 μM Cd²⁺ displayed a ura⁻ phenotype (Fig. 2, picture 6). The ura⁻ phenotype was also observed for cells expressing CadA and exposed to lower Cd²⁺ concentration (1 μM for 21 h) or for a shorter incubation time (2 h in 10 μM Cd²⁺) (data not shown). This suggests that incubation in Cd²⁺ leads to the rapid loss of the expression vector.

The effect is specific for Cd²⁺

As many of its homologues, CadA is activated in vitro by Zn²⁺ and Pb²⁺ in the same concentration range as Cd²⁺ (data not shown). Therefore, we tested the effect

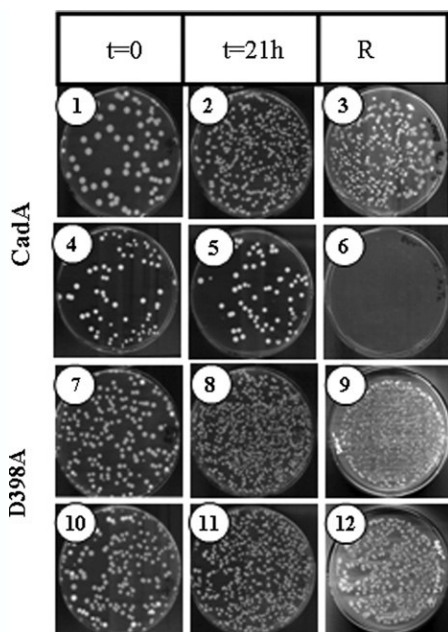


Fig. 2. Effect of Cd^{2+} on yeast growth in liquid cultures. Transformants containing CEN-CadA-HA or CEN-D398A-HA were grown in 3 ml liquid medium without uracil. After 24 h, 500 μl of this preculture was added to 10 ml of the same selective medium. After two generations, the 10 ml was split into two cultures ($t = 0$): one was left unchanged (pictures 1–3 and 7–9) and the other was supplemented with 10 μM Cd^{2+} (pictures 4–6 and 10–12). Cell density was estimated by CFU counting as described in Table 1. The figure shows colonies grown for three days at 30 °C on YD plates coming from the culture at the time of the split ($t = 0$ column) and 21 h later ($t = 21$ h column). To check for a possible plasmid loss at 21 h, the colonies were replicated twice in a row on dropout medium lacking uracil (R column). These results have been reproduced for four independent transformants of each vector.

of these metals and also others on the cells expressing CadA. As shown in Fig. 3A, among the tested ions, Cd^{2+} is the only one inducing growth inhibition at 10 μM . For all the other ions tested, the MIC was higher than 200 μM .

Because of the overlapping properties of Zn^{2+} and Cd^{2+} we checked whether the two metals could compete for the phenotypic assay. Cells expressing CadA or D398A were grown to mid-log phase and analyzed by drop assays onto media containing different $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ ratios. As shown in Fig. 3B, even at the highest $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ ratio, 1 mM Zn^{2+} did not significantly alleviate the growth inhibition induced by 1 μM Cd^{2+} . This suggests that under these conditions, the mechanisms leading to Cd^{2+} toxicity do not significantly interfere with Zn^{2+} metabolism.

CadA produced in yeast is functional and accumulates in the endoplasmic reticulum

CadA- and D398A-HA expression was assessed by Western blotting on crude protein extracts. As shown

in Fig. 4A, CadA-HA and D398A-HA were equally produced and did not display significant proteolytic degradation. The functionality of the proteins produced in yeast was assessed by phosphorylation measurements from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. We previously showed that CadA produced from the baculovirus/Sf9 system is phosphorylated from ATP in the presence of Cd^{2+} and that such phosphoenzyme formation requires Asp^{398} [4]. As shown in Fig. 4B, a preparation of yeast membranes containing CadA-HA displayed a Cd^{2+} -dependent phosphorylation signal, that was absent in membranes containing D398A-HA, confirming that yeasts expressing CadA produced an active Cd^{2+} -ATPase. In addition, this phosphoenzyme formation was transient, as expected for a cycling P-type ATPase [4].

To find out where CadA was localized in the cell, CadA- and D398A-GFP were expressed and followed by fluorescence microscopy. As observed in Fig. 5, the GFP signal was concentrated in either well-defined rings in isolated cells or in the surrounding area of segregating nuclei in dividing cells, and there was no difference between CadA and D398 location (Figs. 5A and B). This perinuclear location was confirmed by the codetection of GFP and Hoechst signals (Figs. 5C and D), suggesting that CadA is expressed in the endoplasmic reticulum membrane (ER).

Discussion

CadA expressed in yeast was shown to be active by a Cd^{2+} -dependent phosphorylation assay and localized in a perinuclear region, presumably ER. A similar location was observed for PMA2, the H^{+} -ATPase from *Nicotiana plumbaginifolia*, localized in membranous structures called *karmellae* [22].

Although CadA has been described as the main resistance determinant to Cd^{2+} in *L. monocytogenes* [3], its expression in yeast increased 100-fold the sensitivity of yeast to Cd^{2+} . Expression of other Cd^{2+} transporters in yeast, such as wheat low affinity cation transporter LCT1 [23] or *Arabidopsis thaliana* Nramp 1, 3 or 4 [24], was also shown to enhance yeast sensitivity to Cd^{2+} . Nevertheless, these proteins are passive transporters and their expression was correlated with an increase in the Cd^{2+} content of the cells, suggesting that they increased Cd^{2+} influx into the cells. No effect on the Cd^{2+} content of the cells was observed here. Indeed, ICP-OES analysis of cells incubated with 10 μM Cd^{2+} for 2 h 30 min gave a Cd^{2+} content of 0.20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ dried weight, whether the cells expressed CadA or D398A.

The phenotype induced by CadA was specific for Cd^{2+} and surprisingly insensitive to Zn^{2+} . This result was unexpected since the high affinity Zn^{2+} transporter Zrt1p is considered as the main Cd^{2+} entry pathway in yeast [25] and has been shown to be down-regulated at

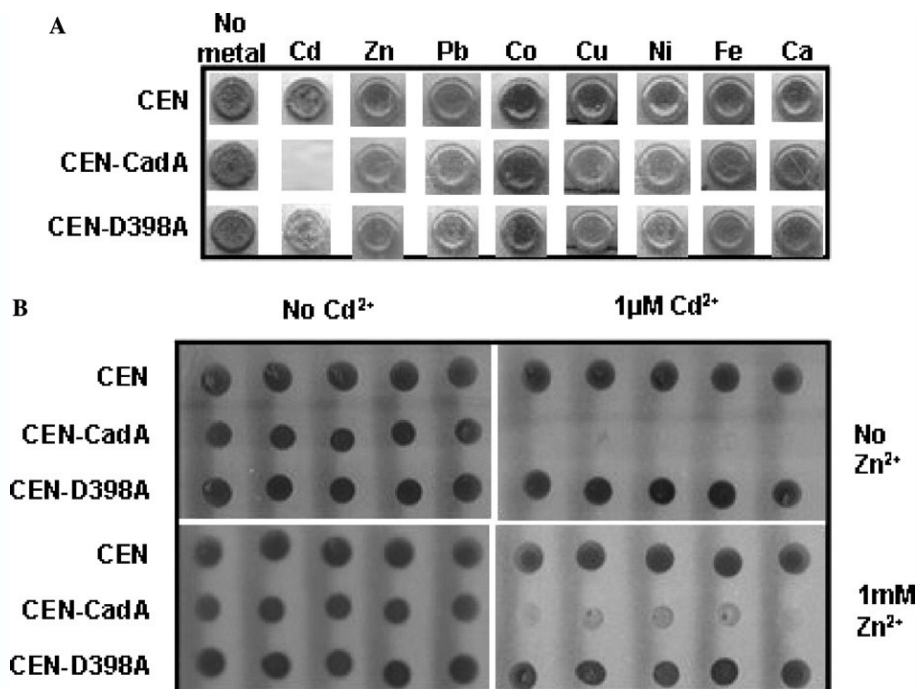


Fig. 3. Effect of various metals. (A) Effect of metals. Drop tests were performed as described in Fig. 1B in the presence of 10 μM CdCl₂, Zn(CH₃COO)₂, Pb(CH₃COO)₂, CoCl₂, CuSO₄, NiCl₂, FeCl₃ or CaCl₂. For Zn²⁺, the same results were obtained with 10 μM ZnCl₂. Ten micromolar MnCl₂ or HgCl₂ did not induce any differences between the three transformants used (data not shown). (B) Effect of different Cd²⁺ to Zn²⁺ ratios. The different transformants were tested on solid selective media containing the indicated concentration of Cd²⁺ and Zn²⁺.

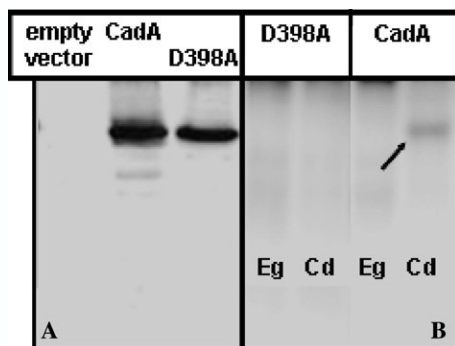


Fig. 4. Immunodetection and phosphorylation from ATP of CadA- and D398A-HA. (A) Immunodetection shows CadA- and D398A-HA expression in yeast membranes. (B) Phosphorylation from 1 μM [γ-³²P]ATP was performed as described in Materials and methods in the presence of (Eg) 100 μM EGTA or (Cd) 30 μM Cd²⁺.

transcriptional and post-translational levels by elevated Zn²⁺ concentrations [26]. Therefore, some other transporters might participate in Cd²⁺ entry, such as the low affinity iron transporter Fet4p [27] and/or the Mn²⁺ transporter Smf1p [28].

Once Cd²⁺ is in the cytoplasm, the (GS)₂Cd complex is known to be transported in the vacuole by Ycf1p [9]. Because we used W303-1A in our experiments, Cd²⁺ transport activity of Ycf1p could be followed by the disappearance of the red color associated with *ade2-1* mutation [29] and this activity was only visible at Cd²⁺

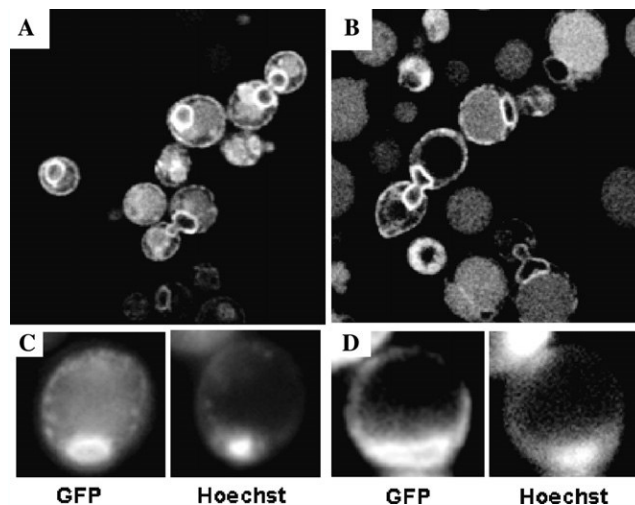


Fig. 5. Intracellular location of CadA-GFP and D398A-GFP. (A,B) Confocal microscopy: D398A-GFP (A) and CadA-GFP (B) are located either as rings in individualized cells or deformed rings in dividing cells. (C,D) Fluorescence microscopy: the GFP signal appears as surrounding the Hoechst signal, indicating a perinuclear location of both CadA-GFP and D398A-GFP.

concentrations higher than 10 μM which is in agreement with previously published MIC [10,12,30]. Comparison with the 1 μM MIC for Cd²⁺ that was measured in this study for CadA expressing yeasts shows that the two Cd²⁺ transport systems do not work in the same

concentration range. The poisoning mechanism induced by CadA expression is much more efficient than the yeast intrinsic detoxification mechanism.

To explain the two opposite CadA-dependent phenotypes in *L. monocytogenes* and in *S. cerevisiae*, CadA location in the two organisms has to be considered. To carry out resistance to Cd²⁺ in *L. monocytogenes*, CadA can only be an efflux pump in the plasma membrane, transporting Cd²⁺ out of the cytoplasm and consuming cellular ATP. In yeast, CadA was inserted in a perinuclear region assumed to be the ER. Therefore, CadA probably transports Cd²⁺ from the cytoplasm into the ER lumen. Once in the ER, Cd²⁺ triggers the toxicity phenomenon.

Consistent with this proposal, it has been shown in *Schizosaccharomyces pombe* that disruption of the gene encoding ER membrane resident cation diffusion facilitator Zhf lowered the strain sensitivity to Cd²⁺ [31]. As commonly admitted, it is likely that once in the ER, Cd²⁺ will interfere with protein biogenesis or signaling pathways by reacting with thiol groups or by substituting for Zn²⁺ or for Ca²⁺. Although not yet fully understood, the phenomenon of CadA-dependent toxicity to Cd²⁺ reveals some additional interesting features. First, microscopic observations of CadA containing cells whose growth is inhibited by Cd²⁺ reveal morphological changes, whether they are budding or not. Second, although their growth is inhibited by Cd²⁺, cells remain viable after 21 h exposure to the metal as shown by plating assays onto a YD medium. Third, these cells that are not dividing exhibit an ura⁻ phenotype, indicating that they have lost their expression vector and suggesting that plasmid removal is part of the cellular response to the Cd²⁺ accumulation in the ER. Plasmid removal being the primary cause of the growth arrest of CadA containing cells is an observation that deserves further studies since Cd²⁺-induced DNA degradation has been described in mammalian cells [32]. If this were the case, a yeast cell expressing CadA could be a useful model to study the role of ER in Cd²⁺ toxicity.

At first glance, the results described herein contradict those of previous studies concerning the effects of P1-type ATPases on yeast resistance to Cd²⁺ [10–12]. The most detailed of them concerns the plant ATPase AtHMA3 from *A. thaliana* that restored the wild type resistance to Cd²⁺ when localized at the vacuolar membrane of *ycf1-Δ* strain cells [12]. Compared to the work on AtHMA3, the present study with CadA demonstrates that the phenotypes simply reflect the intracellular location of the heterologous proteins that do not necessarily have appropriate targeting signals. Because CadA expressed in yeast stays in the ER, our work points out this compartment as particularly sensitive to the toxic properties of Cd²⁺.

In conclusion, the yeast expression system described here appears well suited for functional studies of CadA. Its CadA-dependent sensitivity to Cd²⁺ is a reliable and

simple means to select mutants produced by random or site-directed mutagenesis.

Acknowledgments

This work was supported by the Programme de Toxicologie Nucléaire of the Commissariat à l'Energie Atomique and by the Région Rhône-Alpes and by the CAPES-COFECUB Program 378/02. We thank Didier Grünwald for his expert assistance in confocal microscopy, Véronique Collin for technical assistance with GFP, Bénédicte Salin for her expert assistance in electronic microscopy, Pierre Richaud for his expertise in the inductively coupled plasma OES, and Jean-Marc Moulis and Pierre Richaud for their critical reading of the manuscript.

References

- [1] M. Waisberg, P. Joseph, B. Hale, D. Beyersmann, Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis, *Toxicology* 192 (2003) 95–117.
- [2] D.H. Nies, Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes, *FEMS Microbiol. Rev.* 27 (2003) 313–339.
- [3] M. Lebrun, A. Audurier, P. Cossart, Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to cadA and cadC of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 3040–3048.
- [4] N. Bal, E. Mintz, F. Guillaud, P. Catty, A possible regulatory role for the metal-binding domain of CadA, the *Listeria monocytogenes* Cd²⁺-ATPase, *FEBS Lett.* 506 (2001) 249–252.
- [5] D. Fu, T.J. Beeler, T.M. Dunn, Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca(2+)-sensitive phenotype of *csgI* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu(2+)-ATPase subfamily, *Yeast* 11 (1995) 283–292.
- [6] E. Shiraishi, M. Inoue, M. Joho, H. Tohyama, The cadmium-resistant gene, CAD2, which is a mutated putative copper-transporter gene (PCA1), controls the intracellular cadmium-level in the yeast *S. cerevisiae*, *Curr. Genet.* 37 (2000) 79–86.
- [7] K. Vido, D. Spector, G. Lagniel, S. Lopez, M.B. Toledano, J. Labarre, A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 8469–8474.
- [8] M. Fauchon, G. Lagniel, J.C. Aude, L. Lombard, P. Soularue, C. Petat, G. Marguerie, A. Sentenac, M. Werner, J. Labarre, Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand, *Mol. Cell* 9 (2002) 713–723.
- [9] Z.S. Li, Y.P. Lu, R.G. Zhen, M. Szczypka, D.J. Thiele, P.A. Rea, A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 42–47.
- [10] J. Lee, H. Bae, J. Jeong, J.Y. Lee, Y.Y. Yang, I. Hwang, E. Martinoia, Y. Lee, Functional expression of a bacterial heavy metal transporter in *Arabidopsis* enhances resistance to and decreases uptake of heavy metals, *Plant Physiol.* 133 (2003) 589–596.
- [11] R.F. Mills, G.C. Krijger, P.J. Baccarini, J.L. Hall, L.E. Williams, Functional expression of AtHMA4, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass, *Plant J.* 35 (2003) 164–176.
- [12] A. Gravot, A. Lieutaud, F. Verret, P. Auroy, A. Vavasour, P. Richaud, AtHMA3, a plant P1B-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast, *FEBS Lett.* 561 (2004) 22–28.
- [13] N. Bal, C.C. Wu, P. Catty, F. Guillaud, E. Mintz, Cd²⁺ and the N-terminal metal-binding domain protect the putative membranous

- CPC motif of the Cd^{2+} -ATPase of *Listeria monocytogenes*, Biochem. J. 369 (2003) 681–685.
- [14] J.W. Wallis, G. Chrebet, G. Brodsky, M. Rolfe, R. Rothstein, A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase, Cell 58 (1989) 409–419.
- [15] C.L. Kuo, J.L. Campbell, Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* DNA replication genes: isolation of the CDC8 gene and two genes that compensate for the cdc8-1 mutation, Mol. Cell. Biol. 3 (1983) 1730–1737.
- [16] R.S. Sikorski, P. Hieter, A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*, Genetics 122 (1989) 19–27.
- [17] R.D. Gietz, A. Sugino, New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites, Gene 74 (1988) 527–534.
- [18] D. Burke, D. Dawson, T. Stearns, Yeast protein extracts, in: Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 2000, pp. 115–116.
- [19] M.A. Romanos, C.A. Scorer, J.J. Clare, Foreign gene expression in yeast: a review, Yeast 8 (1992) 423–488.
- [20] I. Degand, P. Catty, E. Talla, D. Thines-Sempoux, A. de Kerchove d'Exaerde, A. Goffeau, M. Ghislain, Rabbit sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase replaces yeast PMC1 and PMR1 Ca^{2+} -ATPases for cell viability and calcineurin-dependent regulation of calcium tolerance, Mol. Microbiol. 31 (1999) 545–556.
- [21] J. Lowe, A. Vieyra, P. Catty, F. Guillaud, E. Mintz, M. Cuillel, A mutational study in the transmembrane domain of Ccc2p, the yeast Cu(I) -ATPase, shows different roles for each Cys-Pro-Cys cysteine, J. Biol. Chem. 279 (2004) 25986–25994.
- [22] A. de Kerchove d'Exaerde, P. Supply, J.P. Dufour, P. Bogaerts, D. Thines, A. Goffeau, M. Boutry, Functional complementation of a null mutation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H^{+} -ATPase by a plant H^{+} -ATPase gene, J. Biol. Chem. 270 (1995) 23828–23837.
- [23] S. Clemens, D.M. Antosiewicz, J.M. Ward, D.P. Schachtman, J.I. Schroeder, The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 12043–12048.
- [24] S. Thomine, R. Wang, J.M. Ward, N.M. Crawford, J.I. Schroeder, Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 4991–4996.
- [25] D.S. Gomes, L.C. Frago, C.J. Riger, A.D. Panek, E.C. Eleutherio, Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*, Biochim. Biophys. Acta 1573 (2002) 21–25.
- [26] R.S. Gitan, H. Luo, J. Rodgers, M. Broderius, D. Eide, Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation, J. Biol. Chem. 273 (1998) 28617–28624.
- [27] D.R. Dix, J.T. Bridgman, M.A. Broderius, C.A. Byersdorfer, D.J. Eide, The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem. 269 (1994) 26092–26099.
- [28] X.F. Liu, F. Supek, N. Nelson, V.C. Culotta, Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene, J. Biol. Chem. 272 (1997) 11763–11769.
- [29] B. Chaudhuri, S. Ingavale, A.K. Bachhawat, apd1+, a gene required for red pigment formation in ade6 mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, encodes an enzyme required for glutathione biosynthesis: a role for glutathione and a glutathione-conjugate pump, Genetics 145 (1997) 75–83.
- [30] J.M. Falcon-Perez, M.J. Mazon, J. Molano, P. Eraso, Functional domain analysis of the yeast ABC transporter Ycf1p by site-directed mutagenesis, J. Biol. Chem. 274 (1999) 23584–23590.
- [31] S. Clemens, T. Bloss, C. Vess, D. Neumann, D.H. Nies, U.A. Zur Nieden, A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance, J. Biol. Chem. 277 (2002) 18215–18221.
- [32] W. Watjen, H. Haase, M. Biagioli, D. Beyersmann, Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc, Environ. Health Perspect. 110 (Suppl. 5) (2002) 865–867.

R.2 Etude fonctionnelle de CadA_{LM} en absence de Mg²⁺

Les résultats de ce chapitre ont été rédigés dans le manuscrit joint à la fin du chapitre. Dans le texte qui suit, les figures du manuscrit sont signalées par la notation m2;Fig.n.

Pendant le cycle enzymatique des ATPases de type P, l'une des étapes essentielles du cycle est la liaison de l'ATP au domaine nucléotidique (N) de l'ATPase, suivie par le transfert du γ -phosphate de l'ATP à l'acide aspartique de la séquence consensus DKTGT du domaine de phosphorylation (P). Il est largement accepté que le complexe MgATP, et non pas la molécule d'ATP libre, est le véritable substrat des ATPases de type P. Ceci est physiologiquement pertinent, puisque Mg²⁺ est vraisemblablement le cation divalent le plus abondant dans la cellule. De plus, cela a été justifié par les études des ATPases de type P_{II} telles que l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a (Vianna, 1975), l'ATPase-Na⁺/K⁺ (Skou, 1974) et l'ATPase-H⁺ (Ahlers *et coll.*, 1978) dont l'activité est stimulée en présence de Mg²⁺. L'affinité de l'ATPase-Ca²⁺ pour l'ATP est plus forte en présence de Mg²⁺ qu'en son absence (Lacapère *et coll.*, 1990). De plus, le Mg²⁺ est censé réduire les charges négatives du domaine de phosphorylation (P) qui comprend plusieurs aspartates (Toyoshima *et coll.*, 2000; Pedersen *et coll.*, 2000; McIntosh *et coll.*, 2004).

Cependant, bien que ni l'ATPase-Na⁺/K⁺, ni l'ATPase-Cu⁺ ne peuvent être activées en l'absence de Mg²⁺, des études montrent que l'ATPase-Ca²⁺ peut être activée par CaATP, MnATP et CoATP (Yamada et Ikemoto, 1980) et que l'ATPase-H⁺ peut l'être par MnATP et CoATP (Supply *et coll.*, 1993), sans addition de Mg²⁺. C'est pour cela que nous supposons qu'il n'y a pas de spécificité intrinsèque du domaine catalytique pour MgATP, mais plutôt le besoin d'un cation divalent qui forme un complexe avec l'ATP au domaine catalytique. Pour l'ATPase-Cd²⁺, ce cation pourrait être le Cd²⁺ lui-même.

Etant donné que **CadA_{LM}** est une ATPase de type P, nous avons voulu savoir si **CadA_{LM}** possédait les caractéristiques fonctionnelles principales des ATPases de type P en absence de Mg²⁺, prenant comme modèle l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a. A savoir: une activité ATPase qui dépend du cadmium transporté, la formation d'une enzyme transitoirement phosphorylée en présence d'ATP et de cadmium. Nous verrons que la formation d'une enzyme phosphorylée stable en présence de phosphate inorganique nécessite la présence de Mg²⁺ car elle est impossible en présence de cadmium. La plupart des travaux précédents sur les ATPases de type P, **CadA_{LM}** de *Listeria monocytogenes* y compris, ont été réalisés en présence de hautes concentrations de Mg²⁺ et basses concentrations des ions transportés. Dans ce chapitre, nous allons examiner le cycle enzymatique de **CadA_{LM}** utilisant CdATP comme substrat, en absence de Mg²⁺.

R.2.1 Activité ATPase de CadA_{LM} en absence de Mg²⁺

Pour mesurer l'activité ATPase de **CadA_{LM}** en absence de Mg²⁺, nous avons mesuré la libération de Pi radioactif après hydrolyse de [γ -³²P]ATP, méthode qui permet de mesurer l'activité ATPase de **CadA_{LM}** en absence de Mg²⁺ à la différence de la méthode des enzymes couplées qui nécessite du Mg²⁺. Pour ces expériences, **CadA_{LM}** a été exprimée dans la levure et la fraction membranaire isolée comme décrit dans l'article du précédent chapitre.

L'activité spécifique de **CadA_{LM}** en absence de Mg²⁺ et en présence de 100 μ M Cd²⁺ et de 100 μ M ATP a été estimée en soustrayant l'activité des membranes de levures n'exprimant pas **CadA_{LM}** de celle de membranes contenant **CadA_{LM}**. On obtient ainsi l'activité ATPase de **CadA_{LM}** en absence de Mg²⁺, soit une activité d'environ 50 nmol d'ATP hydrolysées par minute et par milligramme de protéines totales (m2;Fig.1).

La mesure de l'activité ATPase des préparations membranaires de levure ne contenant pas **CadA_{LM}** donne deux informations intéressantes. La première est qu'il existe une activité ATPase basale propre aux préparations membranaires de levure en absence de Mg²⁺, d'environ 150 nmol/min/mg. La seconde est que la présence de cadmium n'inhibe pas cette activité endogène.

R.2.2 Phosphorylation de CadA_{LM} en absence de Mg²⁺

En prenant le cycle enzymatique de l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a comme modèle de cycle pour tous les membres de la famille des ATPases de type P, le cycle de **CadA_{LM}** est supposé suivre le schéma (m2;scheme1). Dans ce schéma, n figure le nombre encore inconnu d'ions cadmium transportés par cycle. Cependant, pour la clarté de cet exposé, nous parlerons du site de transport du cadmium, comme s'il était démontré que **CadA_{LM}** ne transporte qu'un ion par ATP hydrolysé. Ce cycle décrit un étroit couplage entre la présence de cadmium au site de transport et les réactions chimiques faisant intervenir l'ATP ou le Pi. Dans ce cadre, il est essentiel de noter que la phosphorylation par l'ATP ne peut se produire qu'en présence de cadmium au site de transport, c'est-à-dire après la fixation du cadmium cytoplasmique. Ensuite, l'énergie fournie par l'ATP sous la forme d'un dérivé phosphorylé dit riche en énergie et par nature instable est utilisée pour remanier le site de transport qui s'ouvre vers l'autre côté de la membrane et perd son affinité pour le cadmium. Cette transformation du site de transport permet la dissociation du cadmium du côté extra-cytoplasmique. Enfin, la liaison aspartyl-phosphate au résidu D398 est hydrolysée et l'enzyme prête à recommencer son cycle. Ce cycle enzymatique est réversible et en principe, l'enzyme doit pouvoir synthétiser de l'ATP, à partir de ADP et Pi. Le cycle inverse commence par la phosphorylation de **CadA_{LM}** par du phosphate inorganique en absence de cadmium au site de transport. On voit donc qu'il y a une compétition entre fixation de cadmium au site de transport et phosphorylation par Pi.

D'après ce cycle, nous disposons de 2 propriétés caractéristiques de la fixation du cadmium au site de transport: l'une est la dépendance en cadmium de la phosphorylation par l'ATP et l'autre est au contraire l'inhibition par le cadmium de la phosphorylation par le Pi. Ce sont ces deux propriétés que nous avons plus particulièrement exploitées. Toutes les expériences biochimiques qui suivent ont été réalisées sur des préparations membranaires de levure exprimant **CadA_{LM}** ou ses mutants en absence de Mg²⁺, ce qui garantit l'homogénéité de nos observations biochimiques d'une part, phénotypiques d'autre part.

R.2.2.1 phosphorylation par l'ATP selon de la concentration de cadmium

La figure (m2;Fig.2A) montre l'analyse par électrophorèse sur gels acides d'extraits membranaires de cellules exprimant **CadA_{LM}** en présence de [γ -³²P]ATP. Cette figure démontre qu'en absence de Mg²⁺, **CadA_{LM}** forme un intermédiaire phosphorylé en présence de cadmium et sa formation est maximale aux environs de 500 μ M de cadmium. **CadA_{LM}** est incubée en présence de différentes concentrations de cadmium, puis phosphorylée par 1 μ M d'ATP radioactif qui induit le cycle enzymatique. L'arrêt de ce cycle après 15 secondes permet de révéler le dérivé phosphorylé. La figure (m2;Fig.2A) montre que la présence de cadmium est nécessaire à la phosphorylation par l'ATP. Elle montre aussi que le niveau de phosphorylation reste sensible à la concentration de cadmium jusqu'à 500 μ M. Nous avons donc voulu contrôler si **CadA_{LM}** est encore capable de parcourir son cycle à 500 μ M de cadmium et en absence de Mg²⁺.

R.2.2.2 déphosphorylation du dérivé phosphorylé en fonction du temps

La figure (m2;Fig.3) montre l'évolution au cours du temps de la phosphorylation de **CadA_{LM}** par 1 μ M d'ATP en présence de 500 μ M de cadmium et en absence de Mg²⁺. Le signal de phosphorylation de **CadA_{LM}** baisse d'intensité jusqu'à épuisement de l'ATP en 3 minutes environ. Cette déphosphorylation spontanée est due à la consommation de l'ATP par **CadA_{LM}** et par les autres ATPases de la membrane. Il n'y a donc pas d'inhibition du cycle enzymatique.

R.2.2.3 déphosphorylation du dérivé phosphorylé par la dilution isotopique

Pour renforcer ce constat, la figure (m2;Fig.4) montre la dilution isotopique par de l'ATP non radioactif. Après 15 s de phosphorylation par 1 μ M d'ATP radioactif, l'isotope a été dilué par la concentration d'ATP non radioactif indiquée dans la figure. Quinze secondes après la dilution, le cycle a été interrompu comme précédemment par précipitation acide. Dans ces expériences, l'ajout d'ATP non radioactif entretient le cycle enzymatique et la diminution du dérivé phosphorylé préalablement marqué au P³² est la manifestation du cycle.

Cette expérience confirme donc que **CadA_{LM}** parcourt son cycle. Plus la concentration d'ATP non radioactif est grande, plus la diminution des signaux est significative dans le laps de temps de 15 s où on est loin de l'épuisement de l'ATP radioactif initial. L'enzyme **CadA_{LM}** exprimée dans la levure est donc bien fonctionnelle.

R.2.2.4 Le dérivé phosphorylé formé à 500 μ M de cadmium est sensible à l'ADP.

Pour savoir si le cycle enzymatique de **CadA_{LM}** en absence de Mg^{2+} est réversible selon le schéma (m2;scheme1), nous avons induit la déphosphorylation du dérivé phosphorylé par l'addition d'ADP. Dans la figure (m2;Fig5), la protéine est d'abord phosphorylée par 1 μ M d'ATP en présence de 500 μ M Cd^{2+} et en absence de Mg^{2+} pendant 15 s avant l'ajout de différentes concentrations d'ADP mélangé à 5 mM d'EGTA 5 mM. L'EGTA bloque le cycle enzymatique en chélatant tout le cadmium. Quinze secondes après l'ajout du mélange, le signal de phosphorylation disparaît et ce d'autant plus que la concentration d'ADP augmente. A 1 mM d'ADP, le signal a diminué de 90%. Cela signifie que 90% du dérivé phosphorylé formé à 500 μ M de cadmium est sensible à l'ADP. Les 10% qui restent n'ont plus de cadmium fixé et ne sont plus sensibles à l'ADP. Nous avons vérifié cette interprétation en testant la sensibilité à l'ADP en absence d'EGTA (m2;Fig6). Cette fois-ci, à 1 mM d'ADP, le signal a complètement disparu, car les 500 μ M de cadmium bloquent le dérivé phosphorylé sous sa forme sensible à l'ADP.

R.2.2.5 La phosphorylation par le CdPi

CadA_{LM} étant phosphorylable en absence de Mg^{2+} , il faut admettre que CdATP est un substrat de l'ATPase. D'autre part, cette réaction est bien réversible, puisque l'ajout d'ADP induit la déphosphorylation. Ces résultats signifient que le domaine de phosphorylation accepte le Cd^{2+} comme co-substrat, ce qui suggère que la réaction dans le sens reverse du cycle doit également être possible. En principe donc, **CadA_{LM}** devrait pouvoir être phosphorylée par le phosphate inorganique, en présence de Cd^{2+} . Cependant, le Cd^{2+} étant aussi l'ion transporté par **CadA_{LM}**, on sait que sa présence au site de transport rend l'ATPase phosphorylable par l'ATP, et non plus par le Pi. Il n'y a donc pas de possibilité d'obtenir un dérivé phosphorylé

stable en présence de Cd^{2+} et Pi . Par contre, nous pouvons espérer observer une phosphorylation transitoire en ajustant les conditions expérimentales pour favoriser la vitesse de la réaction de phosphorylation au détriment de celle de la fixation du Cd^{2+} au site de transport, comme cela a été fait pour la phosphorylation de l'ATPase- Ca^{2+} par le CaPi (Mintz *et coll.*, 1990). A ce jour, nous n'avons pas encore trouvé de telles conditions expérimentales. La phosphorylation de **CadA_{LM}** par le CdPi n'est donc pas encore démontrée.

R.2.3 Phosphorylation de CadA_{LM} en présence de Mg^{2+}

La formation de l'intermédiaire phosphorylé de **CadA_{LM}** par Pi a été étudiée en présence de Mg^{2+} et différentes concentrations de Cd^{2+} . En absence de Cd^{2+} et en présence de Mg^{2+} , **CadA_{LM}** peut être phosphorylée par MgPi (m2 ;Fig.8A). Par contre, en présence de cadmium, la formation de l'intermédiaire phosphorylé de CadA est complètement inhibée à partir de $10\ \mu\text{M}$ de cadmium (m2;Fig.8B). On met en évidence dans cette expérience la concentration de $10\ \mu\text{M}$ qui permet également de phosphoryler **CadA_{LM}** par l'ATP en présence de Mg^{2+} (Figure R3). **CadA_{LM}** est donc comme toute ATPase de type P, phosphorylable par l'ATP en présence du métal qu'elle transporte (le cadmium) et par le Pi en absence de ce métal.

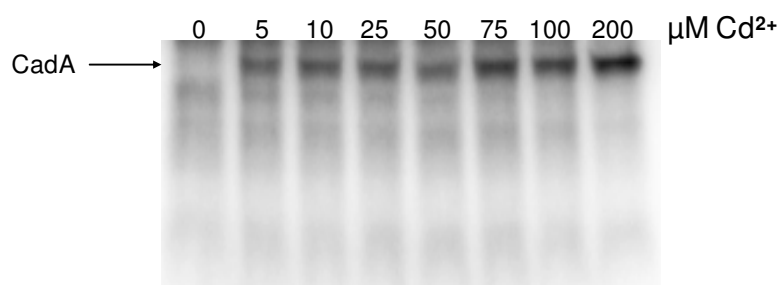


Figure R3 La phosphorylation de **CadA_{LM}** après 15 s en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ $1\ \mu\text{M}$, Mg^{2+} 1mM et Cd^{2+} variable.

R.2.4 Les effets de Mg^{2+} sur $CadA_{LM}$

La figure (m2;Fig.2C) montre qu'en présence de 100 μM de Cd^{2+} , il n'y a que 20% de dérivé phosphorylé, même en présence de 5 mM de Mg^{2+} , ce qui s'oppose à l'idée généralement admise que le MgATP est le substrat le plus efficace des ATPases de type P. Pour faciliter la comparaison, nous avons mesuré la phosphorylation de **$CadA_{LM}$** par 1 μM d'ATP en présence de 100 μM de Cd^{2+} et de 0 à 10 mM de Mg^{2+} . Les niveaux de phosphorylation détectés sur le même gel ne sont pas différents (m2;Fig.2E). On sait que les complexes CdATP et MgATP se forment selon les constantes de dissociation $pK_d=5.34\pm0.02$ pour Cd^{2+} et $pK_d= 4.29\pm0.02$ pour Mg^{2+} . Cela permet de calculer qu'entre 0 et 90% MgATP, le signal est toujours constant, indiquant que MgATP n'est pas un meilleur substrat que CdATP.

Nous avons réalisé une autre expérience pour chercher si le Mg^{2+} a un effet accélérateur du cycle de **$CadA_{LM}$** au niveau de l'étape de déphosphorylation. En ajoutant différentes concentration de Mg^{2+} mélangé à 5 mM EGTA après 15 s de phosphorylation par 1 μM d'ATP radioactif en présence de 500 μM de cadmium, nous avons observé que le signal de phosphorylation de **$CadA_{LM}$** ne change pas d'intensité (m2;Fig.7). Cela signifie que la présence de Mg^{2+} n'a pas stimulé la déphosphorylation du dérivé phosphorylé.

R.2.5 Phosphorylation par l'ATP en présence d'autres métaux

A l'opposé de ce qui est observé sur la croissance de la levure exprimant **$CadA_{LM}$** en présence de différents métaux, qui montre que seul le cadmium a un effet, la figure R4 montre que **$CadA_{LM}$** est phosphorylée par l'ATP en présence de zinc et de plomb. Nous savons que **$CadA_{LM}$** est capable de transporter du zinc et du plomb, en plus du cadmium. Ces expériences suggèrent que le Mg^{2+} n'est peut-être pas nécessaire à cette activité. Néanmoins, on peut observer que la phosphorylation de **$CadA_{LM}$** en présence de zinc ou de plomb semble moins efficace qu'en présence de cadmium dans cette expérience.

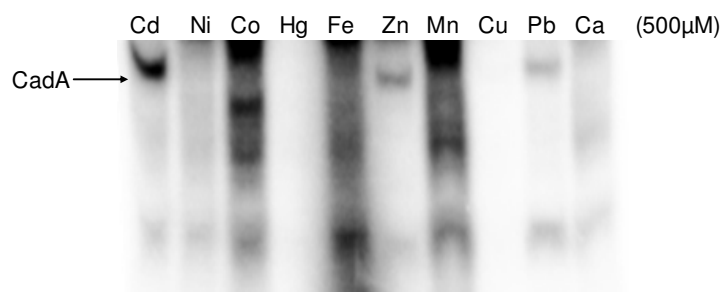


Figure R4 La phosphorylation de **CadA_{LM}** après 15 s en présence de [γ - ^{32}P]ATP 1 μM et les différents cations indiqués 500 μM .

Dans ce chapitre, nous avons tenté de caractériser fonctionnellement les sites de **CadA_{LM}**. Grâce au fait que **CadA_{LM}** transporte du cadmium, nous avons pu montrer que son site catalytique accepte le Cd^{2+} comme co-facteur de la phosphorylation. Ce résultat peut éventuellement être généralisé à toutes les ATPases de type P, nous y reviendrons dans la discussion générale. La dépendance en cadmium de la phosphorylation suggère que le site de transport de **CadA_{LM}** a une affinité apparente meilleure que 10 μM qui induit la phosphorylation par ATP et l'inhibition de la phosphorylation par P_i (étape 1 du cycle). Enfin, l'accumulation de phosphoenzyme sensible à l'ADP dans la gamme 500 μM à 1 mM suggère une affinité apparente du site de transport de l'enzyme phosphorylé aux alentours de 250 μM (étape 3 du cycle). Cette caractérisation fonctionnelle des affinités du site de transport va servir de base à l'identification d'acides aminés participant au site de transport, objet du chapitre suivant. Nous nous référons au site de haute affinité, c'est-à-dire au site d'affinité meilleure que 10 μM sur la protéine sauvage et au site de basse affinité qui provoque l'accumulation du dérivé phosphorylé de la protéine sauvage à partir de 500 μM .

Reaction mechanism of CadA, the Cd²⁺-ATPase from
Listeria monocytogenes

Introduction

The *CADA* gene was first identified as a Cd^{2+} -resistance determinant in *Listeria monocytogenes* (1). It encodes an integral protein of relative molecular mass 76,000 Da. Analysis of its primary sequence shows that CadA belongs to the P-type ATPase family. These ATPases are membranous proteins coupling ATP hydrolysis and active transport of one (or more) cation across the membrane they are embedded in. They are predicted to have 8 to 10 transmembrane helices and two cytoplasmic domains comprising the major amino acid sequence signatures of the family (2). The largest cytoplasmic domain contains the ATP binding or N-domain and the phosphorylation or P-domain, the latter bearing the DKTGT consensus sequence which defines the family. The highly conserved aspartate residue of this sequence is phosphorylated during the P-type ATPase cycle, hence their name. The catalytic cycle of CadA has been studied before, including translocation of Cd^{2+} and formation of a phosphoenzyme from ATP, or from P_i in the reverse mode (3). In the presence of Cd^{2+} and Mg^{2+} , CadA is phosphorylated by ATP at Asp398 in the P-domain and forms an acid-stable phosphoenzyme which allows Cd^{2+} translocation across the membrane. Except for a still unknown number of Cd^{2+} ions transported per cycle (see Scheme 1), CadA catalytic mechanism is similar to that proposed for the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (4) which is taken as the model of the P-type ATPase family. The cycle is described as follows (Scheme 1). In the *E* form the Cd^{2+} transport site(s) has a high affinity for Cd^{2+} and a cytosolic orientation. Therefore, *E* is able to capture Cd^{2+} at a low concentration in the cytosolic medium and, after Cd^{2+} binding and in the presence of Mg^{2+} ($\text{Me} = \text{Mg}^{2+}$), Cd_nE is phosphorylated by ATP into $\text{Cd}_n\text{E}\sim\text{PMe}$. According to the model, this phosphoenzyme is unstable and undergoes a conformational change leading to Cd^{2+} dissociation toward the extracellular medium. The Cd^{2+} -deprived phosphoenzyme *E*-PMe has transport site(s) with low affinity for Cd^{2+} and extracellular orientation. Therefore in step 3, Cd^{2+} is physically released out of the cytoplasm. Finally, in step 4, the *E*-PMe phosphoenzyme is hydrolyzed and the enzyme is thus ready for the next cycle. Scheme 1 predicts that in symmetry with the $\text{Cd}_n\text{E}\sim\text{PMe}$ to *E*-PMe transition, the *E* to Cd_nE transition corresponds to a change in affinity and a reorientation of the transport sites. Such a change in CadA affinity for Cd^{2+} has still not been demonstrated, although it is one of the major features of the P-type ATPases mechanism.

During the enzymatic cycle, another key step is the binding of an ATP molecule to the N-domain, followed by the transfer of the γ -phosphate from the bound ATP molecule to Asp398 in the P-domain (step 2 in Scheme 1), provided that the ATPase has already bound the cation(s) to be transported (step 1 in Scheme 1). It is widely accepted that the MgATP

complex, and not ATP on its own, is the actual substrate for P-type ATPase activity. This is physiologically relevant, since Mg^{2+} is presumably the most abundant divalent cation in the cell. In addition, it has been largely substantiated by studies of P_2 -type ATPases such as the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (5), the Na^+, K^+ -ATPase (6) and the H^+ -ATPase (7), that are all described as Mg^{2+} -activated ATPases. The formation of the MgATP complex is expected to reduce electrostatic repulsion of the phosphate group and therefore facilitate binding of ATP, and indeed, the affinity of the Ca^{2+} -ATPase for ATP is higher in the presence of Mg^{2+} than in its absence (8). In addition, Mg^{2+} is thought to reduce the negative charges of the P-domain which is known to comprise many aspartate residues (9-11). However, although neither the Na^+, K^+ -ATPase, nor the Cu^+ -ATPases can be activated in the absence of Mg^{2+} , the Ca^{2+} -ATPase has been shown to be activated by Ca^{2+} on its own, *i.e.* without addition of Mg^{2+} . Therefore, we assume that there is no intrinsic specificity for MgATP , but rather a need for a divalent cation which complexes ATP and/or binds at the P-domain. In agreement with this assumption are the reports that the Ca^{2+} -ATPase can be activated by CaATP , MnATP or CoATP (12) and the H^+ -ATPase by MnATP and CoATP (13).

Up to now, most of the studies of divalent cation transporting ATPases, including CadA, have been performed in the presence of millimolar Mg^{2+} concentrations and low transported metal concentrations. Interestingly enough, Cd^{2+} , the ion transported by CadA, is also known to inhibit many enzymatic activities, including some of the P_2 -type ATPases, by interacting with their metal transport sites (14) or by increasing the concentration of CdATP which competes with MgATP at the nucleotide-binding site (15). This has led us to study whether CadA could perform its catalytic cycle in the absence of Mg^{2+} . We show here that (i) CadA is readily activated by Cd^{2+} and ATP, using CdATP as substrate in the absence of Mg^{2+} and that Mg^{2+} does not seem to be a more efficient co-substrate than Cd^{2+} , and (ii) CadA has two affinities for Cd^{2+} , one high and one low, as expected from a P-type ATPase.

Experimental procedures

Wild-type CADA gene expression, membrane fractions preparations, immunodetection —

All these procedures were performed as described in (16) for *Saccharomyces cerevisiae* and in (3) for *Sf9* cells.

Phosphorylation of CadA from [γ - ^{32}P]ATP — Fifty μg of membrane fraction was suspended in 100 μl of the assay buffer : 250 mM sucrose, 100 mM KCl, 50 mM MOPS-Tris, pH 7.0, CdCl_2 and/or MgCl_2 , as specified. All additional treatments were done as described in the figure legends. The reaction was started by addition of 1 μM [γ - ^{32}P]ATP (specific activity about 0.6 mCi/nmol) and stopped by addition of 1 ml of ice-cold 1 mM KH_2PO_4 in 7 % trichloroacetic acid. The samples were spun down for 15 min at 18,000 g and 4°C and the pellets washed twice by the stop solution. The final pellet was suspended in 60 μl of 5 mM MES-Tris, pH 6.0, 6 M urea, 0.5 M dithiothreitol, 6% SDS and loaded onto an acidic 10% polyacrylamide gel (pH6). After electrophoresis, the proteins were fixed in 10% acetic acid for 10 min and the gel was exposed overnight to a Molecular Imaging screen CS (Bio-Rad). The intensity of the bands was quantified using Bio-Rad Molecular Imager. From time to time, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane for immunodetection and the amount of CadA was determined by densitometry. The ^{32}P incorporation into CadA was then normalized for the amount of CadA detected.

Phosphorylation of CadA from ^{32}P — One hundred μg of membrane fraction was suspended in 100 μl of the assay buffer : 250 mM sucrose, 30% Me_2SO (v/v), 50 mM MES-Tris, pH 6.0, CdCl_2 and/or MgCl_2 , as specified. All additional treatments were done as described in the figure legends. The reaction was started by addition of 10 μM ^{32}Pi (specific activity 0.1 mCi/nmol) and stopped and analyzed as described for phosphorylation of CadA from [γ - ^{32}P]ATP except that the gels were exposed for two days to the screen.

ATPase Activity — The samples were prepared as described for phosphorylation from ATP. The reaction was started by addition of 100 μM [γ - ^{32}P]ATP and stopped at various times by addition of 1 ml of 100 mM HCl-activated charcoal. The charcoal suspensions were centrifuged for 15 min at 18,000 g and 4°C, and the ^{32}Pi released was measured in 20 μl of the supernatant. Spontaneous hydrolysis of [γ - ^{32}P]ATP was measured by mixing the assay buffer and 100 mM HCl-activated charcoal.

Concentrations of free metal and nucleotide complexes — Concentrations of free and nucleotide-bound metal were calculated using the program Winmaxc32 with the following association constants : Cd^{2+} to ATP^{4-} , 5.34 ± 0.02 and to HATP^{3-} , 3.04 ± 0.06 ; Mg^{2+} to ATP^{4-} , 4.29 ± 0.02 and to HATP^{3-} , 2.42 ± 0.05 (17); H^+ to ATP^{4-} , 6.47 and to HATP^{3-} , 4.04.

Results

CadA, the Cd^{2+} -ATPase from *Listeria monocytogenes*, was expressed at a relatively high level in *Saccharomyces cerevisiae*, as described in (16). The advantage of expression in yeast as compared to *Sf9* cells is the relative ease at which cell membranes can be prepared within a few days after transformation with the expression plasmid. The expression level was enough to analyse CadA enzymatic properties.

According to previous studies, a P-type ATPase catalytic cycle can be simplified by a 4 step-scheme as that shown in Scheme 1. Two vectorial steps describe the binding of the transported ion on one side of the membrane (step 1), here the cytoplasm, and its dissociation on the other side (step 3). These steps are interlinked with two chemical steps, phosphoenzyme formation from ATP which brings energy to the enzyme (step 2) and hydrolysis of the acylphosphate bound (step 4). One of the most important features of this cycle is that the absence or presence of Cd^{2+} at the transport site determines the conformation of CadA and therefore whether ATP or Pi can supply phosphate. The substrate for phosphorylation of Cd^{2+} -bound CadA is ATP, whereas the substrate for phosphorylation of Cd^{2+} -free CadA is Pi. This specificity ensures coupling between ATP consumption and Cd^{2+} transport, which has been already demonstrated for CadA (3).

CadA does not need Mg^{2+} to be active — Most of the studies on P-type ATPases, including CadA (3), were performed in the presence of millimolar Mg^{2+} concentrations (Me is Mg^{2+} in Scheme 1) and appropriate concentrations of the transported ion. The reason for such conditions is that Mg^{2+} has been shown to be necessary for ATPase activity of some well characterised P_2 -type ATPases and is ascribed to be an activator (7,18). Moreover, as described in the introduction, MgATP is considered as the actual substrate for P_2 -type ATPases. To determine whether Cd^{2+} can replace Mg^{2+} in CadA catalytic cycle, ATPase activity was measured in the absence of Mg^{2+} on the membrane fraction from yeast cells expressing CadA, in the presence or absence of Cd^{2+} . Control experiments were performed on the membrane fraction from yeast cells transformed with the empty plasmid. All membrane fractions were prepared without adding Mg^{2+} , neither to the lysis, nor to the storage buffer. ATPase activity was measured by detecting ^{32}Pi released from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ during the enzymatic cycle (step 4 in Scheme 1) as described under “Experimental Procedures”. The basal activity of the membrane preparations was about 150 nmol/mg/min at 25°C, whether they contained CadA or not, suggesting that yeast membranes can hydrolyse ATP in the absence of any added metal (Fig.1). Adding Cd^{2+} did not significantly change the control

membrane activity which was 160 nmol/mg/min, whereas it induced a 40%-stimulation of the activity of the membranes containing CadA. The Cd^{2+} -dependent ATPase activity of CadA was estimated in the absence of Mg^{2+} and in the presence of 100 μM Cd^{2+} and 100 μM ATP by subtracting the activity of the wild type membranes from that of the membranes containing CadA. Under these conditions, a yeast cell membrane preparation containing CadA had an activity of 50 nmol/mg/min, a value of the same magnitude as what was previously measured in *Sf9* cells in the presence of 5 mM Mg^{2+} (3). To directly compare with a MgATP stimulated activity, the measurements shown in Fig.1 were repeated in the presence of Mg^{2+} . Unfortunately, MgATP stimulates yeast ATPases which are inhibited by Cd^{2+} . Therefore, we could not measure a reliable Cd^{2+} -dependent activity of CadA in the presence of Mg^{2+} . The specific Cd^{2+} -dependent ATPase activity measured herein, in the absence of Mg^{2+} , demonstrates that CadA can use CdATP as a substrate during its enzymatic cycle (Me is Cd^{2+} in Scheme 1).

CadA is phosphorylated without Mg^{2+} — To further determine the characteristics of CadA enzymatic properties in the absence of Mg^{2+} , phosphoenzyme formation from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ was studied (step 2 in Scheme 1) in the presence of various Cd^{2+} concentrations. After incubation with Cd^{2+} , the membranes were phosphorylated at 25°C with 1 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, the reaction stopped by acid precipitation after 15 s and CadA separated from the other proteins on acidic gels, as described under “Experimental Procedures”. Under these conditions, where CdATP is the only possible substrate, the maximum phosphoenzyme level was reached at 500 μM Cd^{2+} (Fig.2A), whereas Cd^{2+} concentrations higher than 1 mM inhibited phosphorylation. To evaluate the relative amounts of CadA loaded onto the gel, immunodetection (Fig.2B) was performed directly on the acidic gel from which radioactivity had been detected (Fig.2A). The calculated phosphoenzyme levels are plotted in Fig.2C (open circles), where 100% is the maximum level of phosphoenzyme reached in these experiments.

Cd^{2+} -dependence of phosphoenzyme formation does not depend on Mg^{2+} — To examine the effects of Mg^{2+} on phosphoenzyme formation, similar experiments were performed in the presence of 5 mM Mg^{2+} with CadA expressed in yeast cells (filled circles in Fig.2C) and also in the presence of 1 mM Mg^{2+} with CadA expressed in *Sf9* cells (Fig.2D and triangles in Fig.2C). In both cases, the same Cd^{2+} -dependence was observed as that in the absence of Mg^{2+} (compare filled symbols to empty circles in Fig.2C). According to the MgATP and

CdATP dissociation constants (51 and 4.5 μM , respectively (17)), there was excess MgATP under many of these conditions.

The Cd^{2+} -dependence of phosphoenzyme formation appears as a two-step process. A first plateau is reached at 10 μM Cd^{2+} that can be attributed to ATPase activation by Cd^{2+} binding at the transport site (step 1 in Scheme 1). Until 100 μM Cd^{2+} was reached, there was no further stimulation of CadA phosphorylation from ATP in the presence of Mg^{2+} , suggesting that CdATP is equally efficient as a substrate as MgATP. Finally, to avoid difficulties due to comparison between gels, another experiment was designed for direct comparison. Phosphorylation was performed for 15 s in the presence of 1 μM [γ - ^{32}P]ATP, 100 μM Cd^{2+} and 0, 0.1, 1 or 10 mM Mg^{2+} and the samples were deposited on the same gel (Fig.2E). Under these conditions, even 10 mM Mg^{2+} did not enhance phosphorylation. On the contrary, Mg^{2+} induced a 10%-decrease in the phosphoenzyme level. Compare lane 1, 0 Mg^{2+} therefore 100% CdATP, to lane 4, 10 mM Mg^{2+} therefore 90% MgATP and 10% CdATP. All together, these experiments show that Mg^{2+} is not necessary for phosphoenzyme formation from ATP and that MgATP is not a better substrate than CdATP for CadA phosphorylation.

Cd^{2+} concentrations higher than 100 μM drastically stimulate phosphoenzyme formation with 50% effect around 250 μM . Such a high concentration is likely to reflect the dissociation constant from the phosphoenzyme (step 3 in Scheme 1) and suggests that the increase in the phosphoenzyme level is due to an accumulation of the Cd^{2+} -bound phosphoenzyme species, the ADP-sensitive form of the phosphoenzyme.

Dephosphorylation of the phosphoenzyme formed from CdATP — To characterise the phosphoenzyme formed in the absence of Mg^{2+} and in the presence of 500 μM Cd^{2+} , the concentration inducing maximal phosphorylation, phosphoenzyme formation and decrease were measured after phosphorylation by 1 μM [γ - ^{32}P]ATP. As shown in Fig.3, the phosphoenzyme spontaneously dephosphorylated within 3 min. This decay can be attributed to both CadA cycling and ATP consumption by other proteins in the membrane (Fig.1). To observe directly dephosphorylation of CadA, the experiment was performed adding 1 mM EGTA, 15 s after the phosphorylation reaction was initiated. Addition of EGTA stops the reaction by chelating all Cd^{2+} (involved in steps 1 and 3 in Scheme 1) and the observed decay in the phosphoenzyme level is due to the dephosphorylation rate constant (step 4 in Scheme 1) modulated by Cd^{2+} dissociation (step 3 in Scheme 1). Under these conditions, dephosphorylation was achieved within 45 s and there was about 10% phosphoenzyme

dephosphorylating more slowly. Another way to observe CadA cycling is to dilute [γ - ^{32}P]ATP with unlabelled ATP. Once the isotopic dilution has been performed, phosphoenzyme decay is due to enzyme cycling because the acylphosphate bound does not allow P_i exchange on the phosphoenzyme. Isotopic dilutions were performed after 15 s phosphorylation by addition of various concentrations of unlabelled ATP and phosphoenzyme levels were measured 15 s later. Phosphoenzyme decay induced by increasing isotopic dilutions is shown in Fig.4. The results shown in Fig.3 and Fig.4 confirm that CadA is able to cycle in the absence of Mg^{2+} , using CdATP as substrate.

The phosphoenzyme formed from CdATP is sensitive to ADP — Scheme 1 explicitly describes two forms of phosphoenzymes. After Cd^{2+} binding at the cytoplasmic transport site, the first phosphoenzyme is formed from ATP and dephosphorylates upon addition of ADP to synthesize ATP (reversal of step 2 in Scheme 1). The second form of phosphoenzyme results from Cd^{2+} dissociation from the first form and is not ADP-sensitive anymore. To check whether the phosphoenzyme formed in the presence of 500 μM Cd^{2+} and 1 μM ATP is ADP-sensitive, a mixture of 5 mM EGTA plus ADP was added 15 sec after the phosphorylation reaction was initiated and the reaction was stopped 15 sec later. Note that the phosphoenzyme levels in Fig.5 are shown on the same scale as in Fig.3, *i.e.* 100% is the phosphoenzyme level after 15 s phosphorylation. The phosphoenzyme formed under these conditions was sensitive to ADP, suggesting it was able to synthesize ATP (Fig.5) and the more ADP was added, the more efficient was the dephosphorylation within 15 s, up to 1 mM. Even at such high ADP concentrations, there was about 10% phosphoenzyme remaining, suggesting that this amount of phosphoenzyme had released its Cd^{2+} and could not react with ADP anymore. This assumption was further examined by observing the sensitivity to ADP in the absence of EGTA (Fig.6). Under these conditions, high ADP concentrations induced total dephosphorylation, showing that in the presence of 500 μM Cd^{2+} , Cd^{2+} dissociation (step 3 in Scheme 1) was limiting, allowing accumulation of the ADP-sensitive phosphoenzyme.

Mg^{2+} does not activate dephosphorylation — Unexpectedly, the presence of MgATP was not necessary to activate CadA and also did not stimulate phosphoenzyme formation as compared to CdATP (Fig.1 to Fig.4). Mg^{2+} has been reported to destabilize the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase phosphoenzyme (19). To determine whether Mg^{2+} had a similar effect on the dephosphorylation rate of the phosphoenzyme formed in the presence of 500 μM Cd^{2+} and 1 μM [γ - ^{32}P]ATP CadA, a mixture of 5 mM EGTA plus Mg^{2+} was added 15 sec after the

phosphorylation reaction was initiated and the reaction was stopped 15 sec later. As shown in Fig.7, the phosphorylation level was only slightly sensitive to the presence of Mg^{2+} and, if it did anything significant, Mg^{2+} stabilized the phosphoenzyme rather than activated its dephosphorylation.

Effects of Mg^{2+} and Cd^{2+} on CadA phosphoenzyme formed from ^{32}Pi — CadA is known to be phosphorylatable from Pi in the presence of Mg^{2+} and the absence of Cd^{2+} (3). In this study we have shown that the catalytic cycle proposed in Scheme 1 is valid in the absence of Mg^{2+} , *i.e.*, with Me being Cd^{2+} , at least in the forward direction. The reversal of the cycle was also partially demonstrated by the ADP-sensitivity of the phosphoenzyme (Fig.6 and Fig.7). Yet, the possibility for CadA to be phosphorylated by Pi in the absence of Mg^{2+} has not been demonstrated. This is a difficult task, as conditions have to be found favouring Pi phosphorylation (reversal of step 4) to the detriment of Cd^{2+} binding to the transport site (step 1). In other words, it is difficult to bind Cd^{2+} at the catalytic site to phosphorylate CadA by Pi without binding Cd^{2+} at the cytoplasmic transport site, a step which makes CadA phosphorylatable by ATP and not by Pi. Nevertheless, information on the transport site affinity for Cd^{2+} could be gathered from the Cd^{2+} -induced inhibition of phosphoenzyme formation from Pi, in the presence of Mg^{2+} .

Phosphoenzyme was formed from 10 μM ^{32}Pi at pH 6 and in the presence of 30% Me_2SO and millimolar Mg^{2+} , as shown in Fig.8A. The phosphoenzyme formed in the presence of 5 mM Mg^{2+} was inhibited by a few micromolar Cd^{2+} (Fig.8B). These experiments reveal a high affinity for Cd^{2+} which is in agreement with the first plateau observed in the Cd^{2+} -dependence of the phosphoenzyme formed from ATP (Fig.2).

Discussion

Saccharomyces cerevisiae was used to express the Cd^{2+} -ATPase from *Listeria monocytogenes* and produced enough active CadA to allow its enzymatic characterization. The membrane fractions of transformed yeast cells were used to study the Cd^{2+} dependence of CadA phosphoenzyme formation from ATP. Monitoring the incorporation of ^{32}Pi into protein by acidic gel electrophoresis is a sensitive enough assay to pick out CadA phosphoenzyme among the 16 intrinsic P-type ATPases found in yeast membranes (20). The results described here provide evidence that CadA, a P_1 -type ATPase, retains the major features of the P-type ATPase family, even in the absence of Mg^{2+} when the substrate is CdATP. In addition,

phosphoenzyme measurements at various Cd^{2+} concentrations allowed us to evaluate two apparent affinities of Cd^{2+} for CadA.

The phosphoryl transfer reaction at the catalytic site can cope with Cd^{2+} — Cd^{2+} is known to poison cells by many different ways, among which direct inhibition of Ca^{2+} - and Na^+, K^+ -ATPases has been described. These inhibitions were found to arise from three different types, modifications by Cd^{2+} of the ATPases thiols, impairment by Cd^{2+} of the binding of the transported cation, and competition of CdATP with MgATP, the physiological substrate (see for instance (15,21,22)). CadA has only four cysteines, which all four belong to consensus sequences of P1-type ATPases. One pair belongs to the N-terminus CxxC metal binding domain and the other pair to the membranous CPC consensus sequence. Because the four cysteines are involved in Cd^{2+} binding and CadA functioning (3,23), we expected only competition of CdATP with MgATP to occur. In other words, we expected CdATP to be less efficient than MgATP in stimulating CadA activity, in the absence of Mg^{2+} . Actually, we found that CadA was readily activated by Cd^{2+} and that Mg^{2+} did not induce any additional activation (Fig.1 and Fig.2). Therefore, the present results suggest that Cd^{2+} by itself is a co-factor of the phosphoryl transfer reaction from ATP to CadA Asp398. In addition, ADP induced rapid dephosphorylation of the phosphoenzyme formed in the presence of Cd^{2+} and without Mg^{2+} , as expected from what is known from the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, considered as a model of P-type ATPases (24).

Many conserved residues of the P-type ATPases' catalytic domains have been shown to be also conserved in the phosphatases of the haloacid dehalogenase family, leading to the idea that these residues were essential for the phosphoryl transfer reaction (25). This property was further used to determine the amino acids participating to the Mg^{2+} binding site (26) which were recently confirmed by structural (27,28) and site-directed mutagenesis (11) studies of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. The latter study suggests that the role of Mg^{2+} is mainly to reduce the electrostatic repulsion between the ATP γ -phosphate and the catalytic site, which contains at least 2 conserved aspartate residues. CadA has all the conserved residues involved in the Mg^{2+} binding site, so that if the role of Mg^{2+} in the phosphoryl transfer reaction is purely electrostatic, it is not surprising that Cd^{2+} can be as efficient as Mg^{2+} . Other divalent cations such as Co^{2+} , Mn^{2+} and Ca^{2+} were shown earlier to activate the Ca^{2+} -ATPase in place of Mg^{2+} (12).

The possibility for Cd^{2+} to be a co-factor was also suggested earlier in a study of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase ability to be phosphorylated by Pi in the absence of

Mg^{2+} and in the presence of millimolar Cd^{2+} , among other cations (29). The fact that CdATP is substrate of the forward cycle of an ATPase such as CadA and that the ATPase cycle is fully reversible implies that CdPi must be substrate of the reversal cycle. Therefore, CadA should be phosphorylatable from Pi in the presence of Cd^{2+} , at least transiently, until Cd^{2+} binding at the transport site has induced complete dephosphorylation. As mentioned above, we did not find conditions allowing to measure phosphoenzyme formation in the absence of Mg^{2+} . Indeed, phosphoenzyme formation from Pi required the presence of millimolar Mg^{2+} and was inhibited by micromolar Cd^{2+} (Fig.8B), suggesting that Cd^{2+} and Mg^{2+} reacted with different sites of CadA. Micromolar Cd^{2+} binding at the high affinity transport site (step 1 in Scheme 1) inhibited phosphorylation from Pi, whereas millimolar Mg^{2+} binding at the catalytic site stabilized phosphoenzyme formation (step 4 in Scheme 1). Therefore, we can assume that millimolar Cd^{2+} or Mg^{2+} can bind at the catalytic site and participate to the phosphorylation reaction from Pi, but Cd^{2+} , not Mg^{2+} , will simultaneously bind to the transport and catalytic sites, changing CadA conformation and switching its chemical reactivity to Pi to reactivity to ATP, hence inhibiting phosphorylation from Pi.

Mg^{2+} does not modulate CadA cycle as it modulates the Ca^{2+} -ATPase cycle — The most surprising catalytic property of CadA is the absence of effect of Mg^{2+} and MgATP in the enzymatic cycle. Mg^{2+} did not stimulate phosphorylation from ATP (Fig.2E). When added together with EGTA once the phosphoenzyme was formed, Mg^{2+} did not affect the rate of hydrolysis of the phosphoenzyme (Fig.7), although such effect was previously observed on the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. A tentative explanation, that would deserve more experiments to be confirmed, would be that once bound to the catalytic site, Cd^{2+} is not exchangeable. Finally, Mg^{2+} was only necessary for the formation of the phosphoenzyme from Pi (Fig.8A), and this is only due to Cd^{2+} being at the same time a phosphorylation co-factor and the transported cation. Apart from its role in the phosphoryl transfer reaction, Mg^{2+} has been shown to accelerate each step of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase cycle, among which steps 3 and 4 which concern the phosphoenzyme (19,30). No such phenomenon was observed with CadA.

The Cd^{2+} binding sites — CadA was originally shown to confer bacterial resistance toward toxic concentration of Cd^{2+} (1) and membrane vesicles prepared from *Sf9* cells expressing CadA catalyze ATP-dependent accumulation of $^{109}\text{Cd}^{2+}$ inside the vesicles (3). Phosphoenzyme formation from 1 μM ATP (Fig.2C) showed two phases as the Cd^{2+}

concentration increases. The first plateau reached around 10 μM Cd^{2+} would correspond to a cytoplasmic site of high apparent affinity (step 1 in Scheme 1) which would be both responsible for 10% phosphoenzyme formation from 1 μM ATP (Fig.2C) and complete inhibition of CadA phosphorylation from Pi (Fig.8B). The second phase which lead to maximum measurable phosphoenzyme was reached in the presence of 500 μM Cd^{2+} and revealed a low apparent affinity of about 250 μM . This second phase could be attributed to the extracellular transport site from which Cd^{2+} dissociation becomes limiting as Cd^{2+} concentration increases (step 3 in Scheme 1), therefore accumulating the phosphoenzyme species.

Another possible explanation for the difference in the apparent affinity values determined from the two phosphorylation reactions, *i.e.* ATP (Fig.2C) and Pi (Fig.8B), arises from a possible involvement of the N-terminal domain of CadA. Like most of the P_1 -ATPases, CadA has at its N-terminus the Cys-XX-Cys consensus sequence which is specific for heavy metal binding. Both CadA and *E. coli* ZntA were shown to be active even after truncation of their N-terminus, yet the presence or absence of their N-terminus did modulate their ATPase activity (3,31). In addition, *in vitro* interactions between the N-terminus and the ATP-binding domain of the Wilson disease copper ATPase, another P_1 -type ATPase, have been reported to depend on the presence of copper (32). Therefore, there is a possibility for the N-terminus which bears a Cd^{2+} -binding site, to be involved in the Cd^{2+} -dependence of CadA phosphoenzyme formation. Given these facts, it is tempting to speculate on a Cd^{2+} dependent involvement of the N-terminus in regulating CadA phosphorylation and hence, activity.

References

1. Lebrun, M., Audurier, A., and Cossart, P. (1994) *J. Bacteriol.* **176**(10), 3049-3061
2. Axelsen, K. B., and Palmgren, M. G. (1998) *J. Mol. Evol.* **46**(1), 84-101
3. Bal, N., Mintz, E., Guillaín, F., and Catty, P. (2001) *FEBS Lett.* **506**(3), 249-252
4. de Meis, L., and Vianna, A. L. (1979) *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 275-292
5. Vianna, A. L. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **410**, 389-406
6. Skou, J. C. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **339**, 234-245
7. Ahlers, J., Ahr, E., and Seyfarth, A. (1978) *Mol. Cell. Biochem.* **22**, 39-49
8. Lacapère, J. J., Bennett, N., Dupont, Y., and Guillaín, F. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 348-353
9. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. (2000) *Nature* **405**, 647-655

10. Pedersen, P. A., Jorgensen, J. R., and Jorgensen, P. L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 37588-37595
11. McIntosh, D. B., Clausen, J. D., Woolley, D. G., MacLennan, D. H., Vilsen, B., and Andersen, J. P. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**(31), 32515-32523
12. Yamada, S., and Ikemoto, N. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 3108-3119
13. Supply, P., Wach, A., and Goffeau, A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**(26), 19753-19759
14. Verboost, P. M., Flik, G., Pang, P. K., Lock, R. A., and Wendelaar Bonga, S. E. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 5613-5615
15. Toledo-Maciel, A., Goncalves-Gomes, S., de Gouveia Castex, M., and Vieyra, A. (1998) *Biochemistry* **37**, 15261-15265
16. Wu, C. C., Bal, N., Perard, J., Lowe, J., Boscheron, C., Mintz, E., and Catty, P. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**(3), 1034-1040
17. Sigel, H. (1987) *Eur. J. Biochem.* **165**, 65-72
18. Garrahan, P. J., Rega, A. F., and Alonso, G. L. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **448**, 121-132
19. Panet, R., Pick, U., and Selinger, Z. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**(23), 7349-7356
20. Catty, P., de Kerchove d'Exaerde, A., and Goffeau, A. (1997) *FEBS Lett.* **409**(3), 325-332
21. Sumida, M., Hamada, M., Takenaka, H., Hirata, Y., Nishigauchi, K., and Okuda, H. (1986) *J Biochem (Tokyo)* **100**(3), 765-72.
22. Kinne-Saffran, E., Hulseweh, M., Pfaff, C., and Kinne, R. K. (1993) *Toxicol Appl Pharmacol* **121**(1), 22-9.
23. Bal, N., Wu, C. C., Catty, P., Guillain, F., and Mintz, E. (2003) *Biochem. J.* **369**(Pt 3), 681-685
24. Shigekawa, M., and Akowitz, A. A. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**(11), 4726-4730
25. Aravind, L., Galperin, M. Y., and Koonin, E. V. (1998) *Trends Biochem. Sci.* **23**(4), 127-129
26. Ridder, I. S., and Dijkstra, B. W. (1999) *Biochem. J.* **339**(Pt 2), 223-226
27. Toyoshima, C., and Mizutani, T. (2004) *Nature* **430**(6999), 529-535
28. Sorensen, T. L., Møller, J. V., and Nissen, P. (2004) *Science* **304**(5677), 1672-1675
29. Mintz, E., Lacapère, J. J., and Guillain, F. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 18762-18768
30. Shigekawa, M., and Dougherty, J. P. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 1451-1457
31. Mitra, B., and Sharma, R. (2001) *Biochemistry* **40**(25), 7694-7699

32. Tsivkovskii, R., MacArthur, B. C., and Lutsenko, S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**(3), 2234-2242

Figure legends

Figure 1. ATPase activity of CadA in the absence of Mg^{2+} . ATP hydrolysis was measured by detecting ^{32}P i at various times as described under “Experimental Procedures”. ^{32}P i release shown here was calculated as the amount of Pi liberated per mg of total membrane fraction proteins. The assay buffer was 250 mM sucrose, 100 mM KCl, 50 mM MOPS-Tris, pH 7.0 without (\circ , ∇) or with (\bullet , \blacktriangledown) 100 μ M Cd^{2+} . The reaction was carried out on 50 μ g proteins at 25°C, initiated with 100 μ M [γ - ^{32}P]ATP and stopped as indicated. ^{32}P i release increased linearly during the first 2 min. ATPase activity was determined from the regression slopes shown. (\bullet , \circ) yeast cells membranes expressing CadA (\blacktriangledown , ∇) control membranes.

Figure 2. Cd^{2+} concentration dependence of CadA phosphorylation for 15 s by 1 μ M [γ - ^{32}P]ATP. (A, B) Membrane fractions (50 μ g) from yeast cells expressing CadA were incubated for 5 min at 25°C in 50 mM MOPS-Tris, 250 mM sucrose, 100 mM KCl, pH 7.0 with 0, 100, 250, 500, 750, 1000 μ M Cd^{2+} (lanes 1-6). Phosphorylation was initiated with 1 μ M [γ - ^{32}P]ATP, stopped after 15 s and the samples analyzed by gel electrophoresis and autoradiography (A). The amount of CadA on the gel was determined by HA-immunodetection (B). (C) Phosphoenzyme level from experiments such as that depicted in Panels A & B plotted as a function of the Cd^{2+} concentration. Phosphoenzyme levels were calculated from quantification of ^{32}P i incorporation in CadA as shown in (A) corrected for the amount of CadA found by immunodetection as in (B). Conditions were : membranes from yeast cells expressing CadA and phosphorylated (\circ) without Mg^{2+} , (\bullet) in the presence of 5 mM Mg^{2+} , (\blacktriangle) membranes from Sf9 cells expressing CadA and phosphorylated in the presence of 1 mM Mg^{2+} (from the gel shown in D). Data points represent average values of 2 to 4 determinations. (D) Membrane fractions (50 μ g) from Sf9 cells expressing CadA were incubated for 5 min at 25°C in 30 mM Mops-Tris (pH 7) and 1 mM Mg^{2+} with 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 μ M Cd^{2+} (lanes 1-6) and phosphorylated as before. (E) Phosphorylation of membranes (50 μ g) from yeast cells expressing CadA in the presence of 100 μ M Cd^{2+} and 0, 0.1, 1, 10 mM Mg^{2+} .

Figure 3. Spontaneous and EGTA-induced dephosphorylation of the phosphoenzyme formed without Mg^{2+} and in the presence of 500 μM Cd^{2+} . Membranes (50 μg) from yeast cells expressing CadA were incubated in 500 μM Cd^{2+} without Mg^{2+} and phosphorylated with 1 μM [γ - ^{32}P]ATP. Upper gel, lanes 1-6, the reaction was stopped at 15, 30, 45, 60, 120 and 180 s, and the phosphoenzyme level was quantified (\circ). Lower gel, lanes 1-6, after 15 s phosphorylation (lane 1), 1 mM EGTA was added to the reaction medium and the reaction stopped 15, 30, 45, 60 and 120 s later (lanes 2-6), and the phosphoenzyme quantified (\bullet).

Figure 4. Isotopic dilution of the phosphoenzyme formed without Mg^{2+} and in the presence of 500 μM Cd^{2+} . Membranes (50 μg) from yeast cells expressing CadA were incubated in 500 μM Cd^{2+} without Mg^{2+} and phosphorylated with 1 μM [γ - ^{32}P]ATP. After 15 s phosphorylation, unlabelled ATP was added to the reaction medium and the reaction was stopped 15 s later. Lanes 1-5, unlabelled ATP concentrations were 0, 2, 20, 200, 1000 μM . Phosphoenzyme was quantified and plotted as a function of unlabelled ATP concentration.

Figure 5. EGTA plus ADP-induced dephosphorylation of the phosphoenzyme formed without Mg^{2+} and in the presence of 500 μM Cd^{2+} . Membranes (50 μg) from yeast cells expressing CadA were incubated in 500 μM Cd^{2+} without Mg^{2+} and phosphorylated with 1 μM [γ - ^{32}P]ATP. After 15 s phosphorylation, a mixture of 5 mM EGTA plus ADP was added to the reaction medium and the reaction was stopped 15 s later. Lanes 1-4, ADP concentrations were 0, 0.1, 1, 10 mM. Phosphoenzyme was quantified and plotted as a function of ADP concentration.

Figure 6. ADP-induced dephosphorylation of the phosphoenzyme formed without Mg^{2+} and in the presence of 500 μM Cd^{2+} . Membranes (50 μg) from yeast cells expressing CadA were incubated in 500 μM Cd^{2+} without Mg^{2+} and phosphorylated with 1 μM [γ - ^{32}P]ATP. After 15 s phosphorylation, ADP was added to the reaction medium and the reaction was stopped 15 s later. Lanes 1-5, ADP concentrations were 0, 0.01, 0.1, 1, 10 mM. Phosphoenzyme was quantified and plotted as a function of ADP concentration.

Figure 7. Effect of Mg^{2+} on the EGTA-induced dephosphorylation of the phosphoenzyme formed without Mg^{2+} and in the presence of 500 μM Cd^{2+} . Membranes (50 μg) from yeast cells expressing CadA were incubated in 500 μM Cd^{2+} without Mg^{2+} and

phosphorylated with 1 μM [γ - ^{32}P]ATP. After 15 s phosphorylation, a mixture of 5 mM EGTA plus Mg^{2+} was added to the reaction medium and the reaction was stopped 15 s later. Lanes 1-4, Mg^{2+} concentrations were 0, 0.1, 1, 10 mM. Phosphoenzyme was quantified and plotted as a function of Mg^{2+} concentration.

Figure 8. Antagonistic effects of Mg^{2+} and Cd^{2+} on CadA phosphorylation by Pi. (A) Membranes (100 μg) from yeast cells expressing CadA were incubated in 30% Me_2SO (v/v), 250 mM sucrose, 50 mM MES-Tris (pH 6.0) and Mg^{2+} for 5 min at 25°C. Phosphorylation was initiated by addition of 10 μM ^{32}Pi and stopped 5 min later. Lanes 1-4, Mg^{2+} concentrations were 0.1, 1, 5, 10 mM. (B) Membranes (100 μg) from yeast cells expressing CadA were incubated in 30% Me_2SO (v/v), 250 mM sucrose, 50 mM MES-Tris (pH 6.0), 5 mM Mg^{2+} and Cd^{2+} for 5 min at 25°C. Phosphorylation was initiated by addition of 10 μM ^{32}Pi and stopped 5 min later. Lanes 1-4, Cd^{2+} concentrations were 0, 1, 5, 10 μM .

Scheme 1

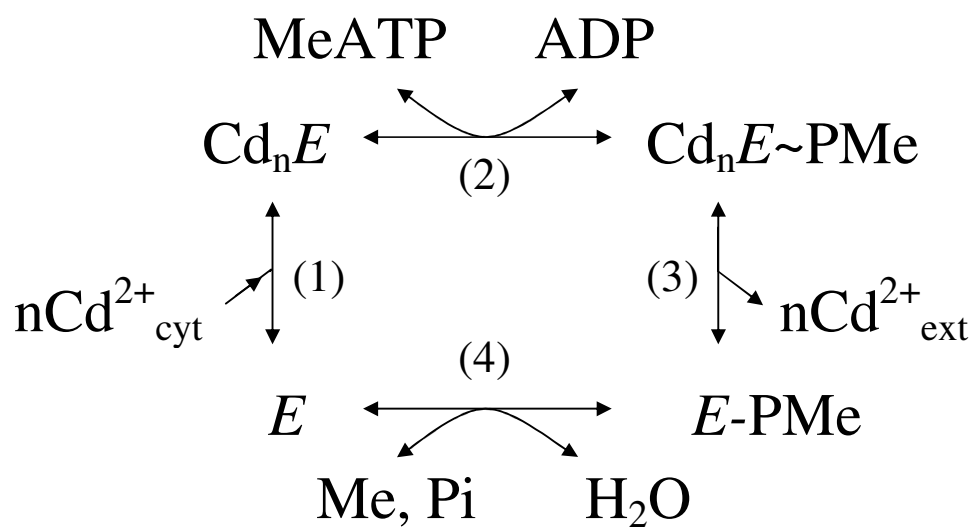


Figure 1

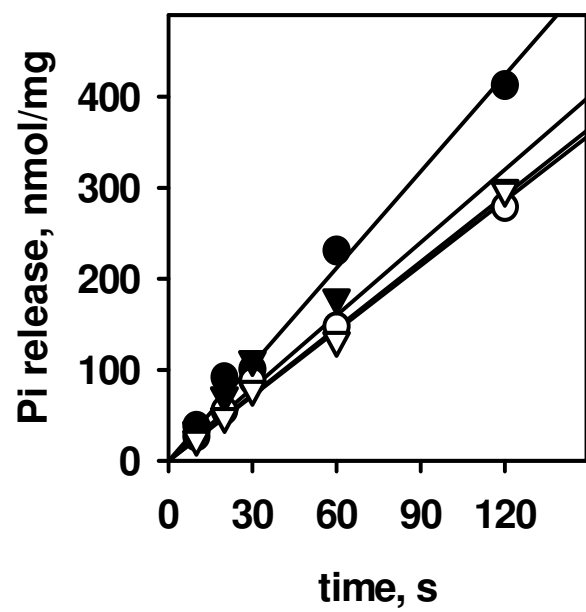


Figure 2

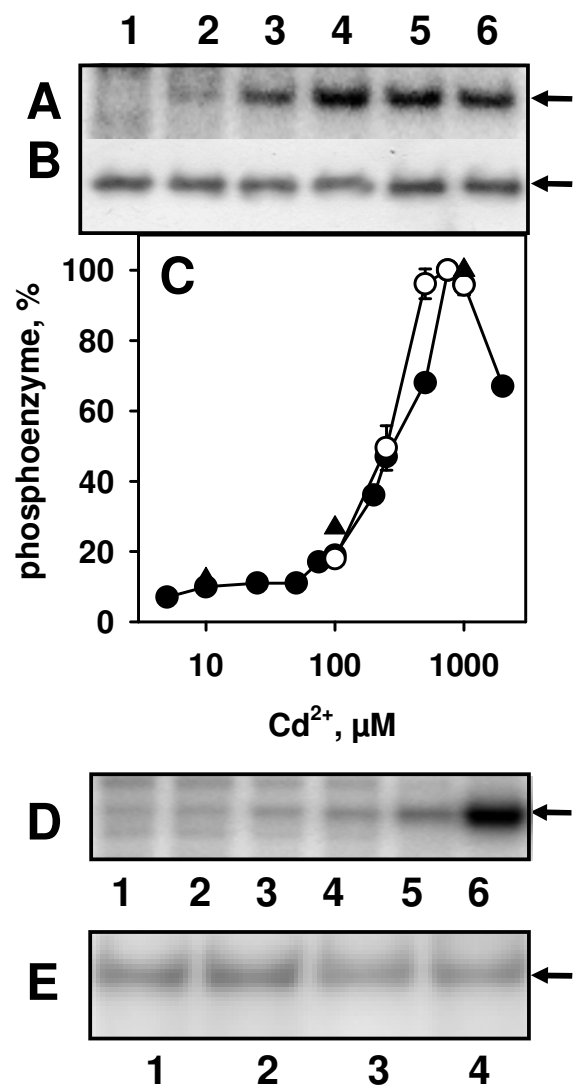


Figure 3

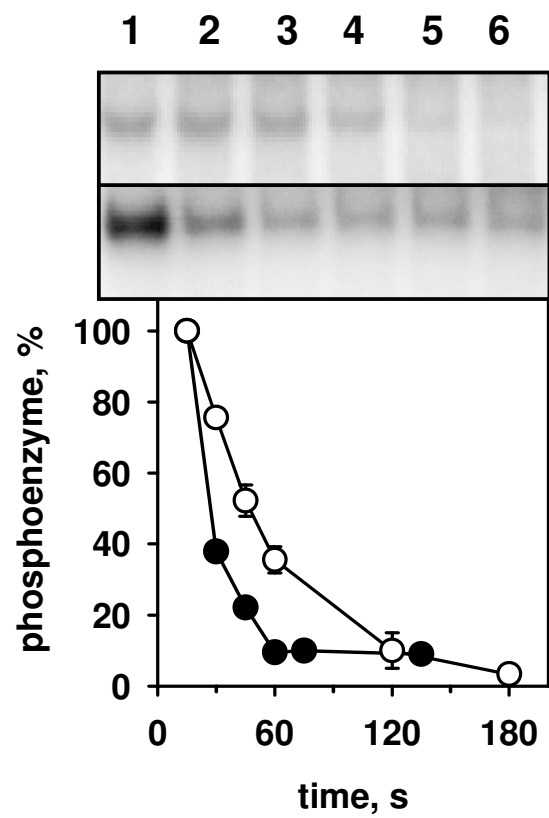


Figure 4

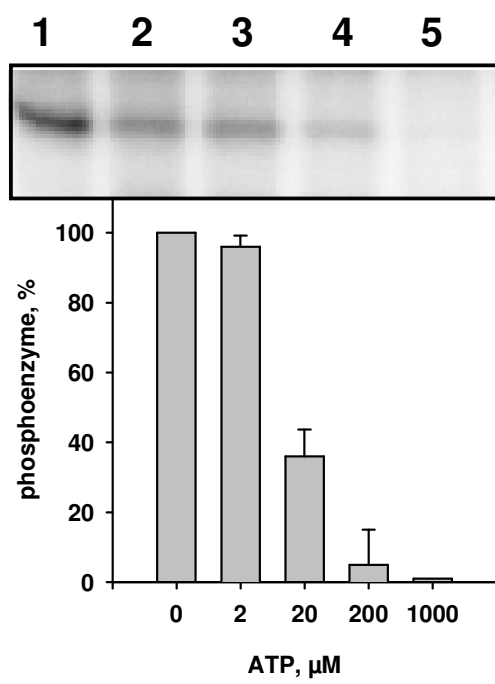


Figure 5

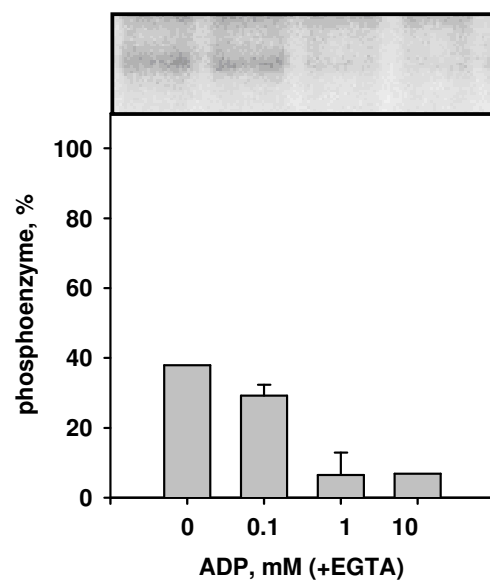


Figure 6

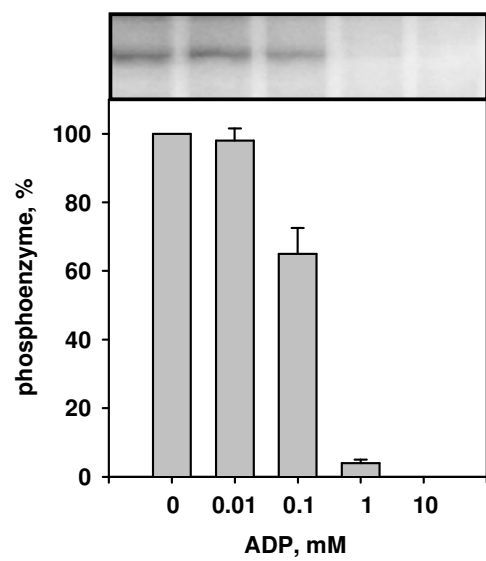


Figure 7

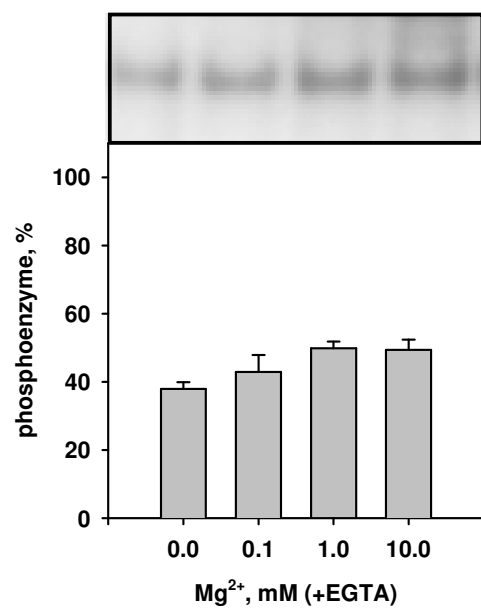
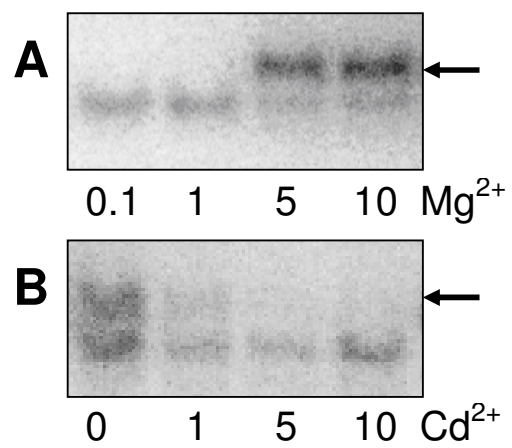


Figure 8



R.3 Identification et caractérisation des sites de transport de CadA_{LM}

Comme le montre la figure I6, le cycle enzymatique d'une ATPase de type P reflète un étroit couplage entre hydrolyse de l'ATP et transport ionique. Le site de transport est un site membranaire capable de lier le cation à transporter et susceptible de « déformations locales » permettant son orientation vers une face ou l'autre de la membrane. C'est la mise en évidence et la caractérisation de ce site sur **CadA_{LM}** qui sont à l'origine de mon projet de thèse.

R.3.1 Analyse préliminaire de CadA_{LM}

Il n'existe pas de structure tridimensionnelle connue d'ATPase de type P_I et la seule structure connue d'ATPase de type P est celle de l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a dont l'homologie de séquence avec **CadA_{LM}** est très faible et dont on ne peut donc se servir comme modèle pour décrire la topologie de **CadA_{LM}**. Nous avons donc utilisé différentes méthodes de prédiction de profil d'hydrophobicité pour délimiter les segments transmembranaires de **CadA_{LM}** (Figure R5).

R.3.2 Choix des acides aminés

En nous inspirant de l'étude du site de transport du calcium de l'ATPase SERCA1a, nous avons réalisé une série de mutagenèses dirigées ponctuelles visant des acides aminés chargés ou polaires des segments transmembranaires de **CadA_{LM}**. Parmi ces acides aminés, nous avons essayé de privilégier lorsque cela était possible, ceux qui sont conservés dans les segments transmembranaires des ATPase-Cu⁺ telles les ATPases Wilson et Menkes humaines et l'ATPase Ccc2p de la levure et sont donc susceptibles d'être essentiels au fonctionnement des ATPases de type P_I (Figure R6).

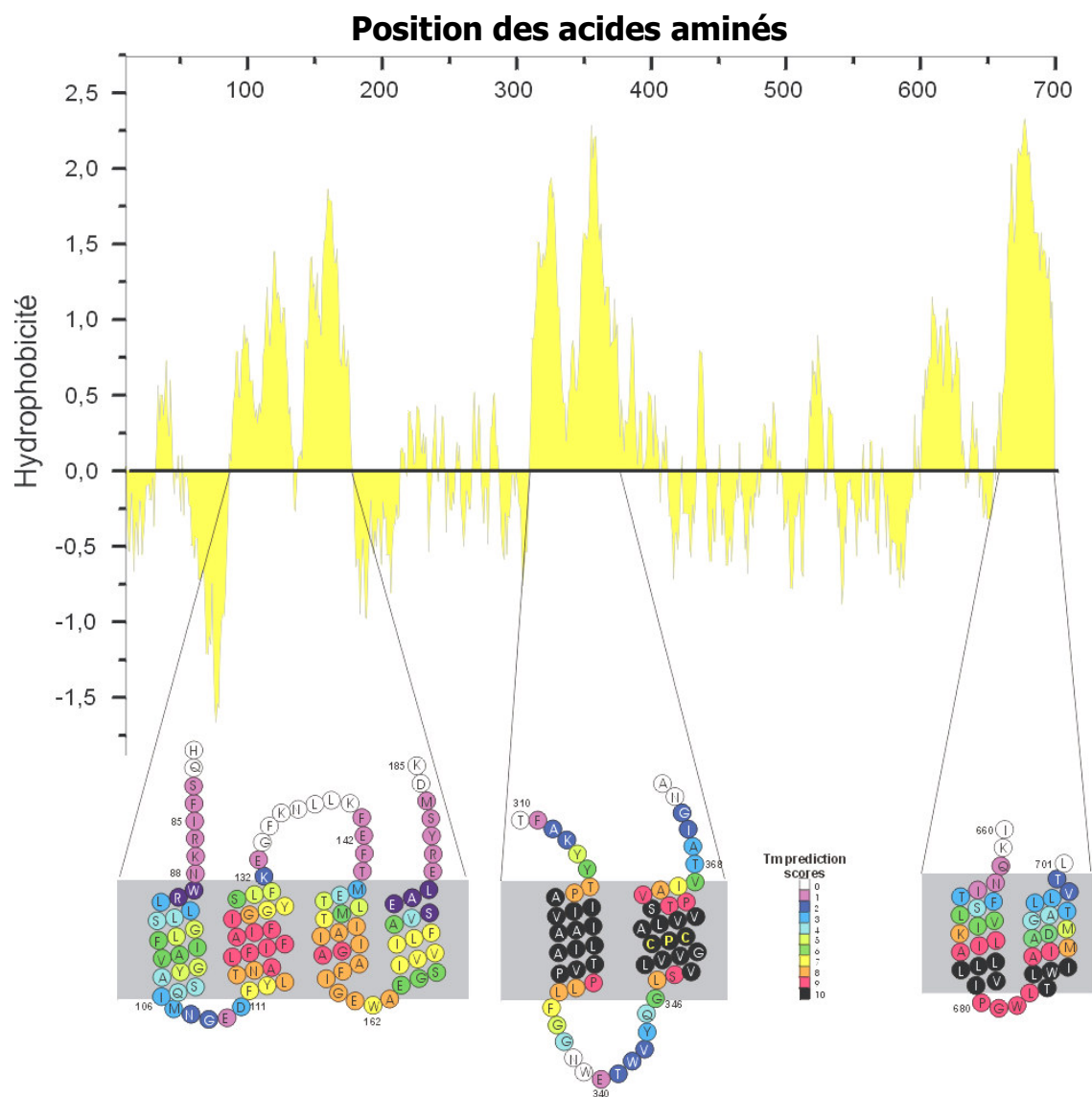


Figure R5. Profil d'hydrophobicité et prédiction des segments transmembranaires de **CadA_{LM}**. L'échelle de couleurs représente le nombre de prédictions donnant un acide aminé comme membranaire

TM1	2	Menkes : FLVSLFFCI ⁿ PVMGLMTYMMVMD : 675 Wilson : FLCSLVFGIPVMALMIYMLIPS : 644 Ccc2p : IKSTLLAI ⁿ CMLLYMIVPMMWP : 280 CadA : FIRKNWRLLL ⁿ SGLFIAVGYASQ : 105
TM2	3	Menkes : L ⁿ SFLLCVPVQ ^L FFGGWYFYIQ : 734 Wilson : IFFILCTFVQL ⁿ GGWYFYVQ : 688 Ccc2p : LGVILASYIQ ⁿ SVGFYFYKA : 324 CadA : L ⁿ TN ^L AFIFAT ⁿ IGGY ⁿ SLFKE : 133
TM3	6	Menkes : KTANMDVLIVLATTIAFYSL : 762 Wilson : RSANMDVLIVLATSIAYVYSL : 714 Ccc2p : GSGTMDTLVCVSTTCAYTFSV : 352 CadA : FEF ^p TE ^m ET ^m MT ^m IAIIGAAFIGE : 161
TM4	5	Menkes : DTPPMLFVFIALGRWLEHIAK : 802 Wilson : DTPPMLFVFIALGRWLEHLAK : 754 Ccc2p : DTSIMIISY ⁿ ISIGKYLETIAK : 394 CadA : A ^p ES ⁿ IVVILFAV ⁿ SE ⁿ ALRYSM : 183
TM5	1	Menkes : SGYFVPFIVFVSIATLLVWI : 957 Wilson : SGYFVPFIIIMSTLTLVWVI : 909 Ccc2p : ASIFVPGILILAVLTFFIWC : 546 CadA : AKYYTPAIIIVIAALIA ⁿ TVPP : 332
TM6	6	Menkes : QASITVLCIA ^p CPCSLGLATPTA : 1011 Wilson : QTSITVLCIA ^{Vn} CPCSLGLATPTA : 963 Ccc2p : QTATSVVIVACPCALGLATPTA : 594 CadA : YQGL ⁿ SVLVVG ⁿ PCALV ⁿ STPVA : 365
TM7	2	Menkes : INFVFALIIYNLVGIIPIAA : 1374 Wilson : INLVLALIIYNLVGIIPIAA : 1309 Ccc2p : LNLFWALCYNIFMIPIAM : 917 CadA : Q ^N ITF ^L SLVIK ^L IALLLVI : 679
TM8	5	Menkes : QPWMGSAAMAASSVS ^A VLISSLF : 1406 Wilson : QPWMGSAAMAASSVS ^{pn} VLISSIQ : 1341 Ccc2p : PPMLAGLAMAFSSVS ^V VLISSLM : 949 CadA : TL ^L WIAIM ^{AD} MGAT ^L LLVTINGLR : 705

Figure R6 Alignements des segments transmembranaires des ATPases-Cu⁺ humaines Menkes et Wilson, ATPase-Cu⁺ Ccc2p de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, et de l'ATPase-Cd²⁺ **CadA_{LM}** de *Listeria monocytogenes*. En vert, 100% d'identité (majuscule dans la ligne "consensus"), en jaune 75% d'identité, en gris, 50% d'identité. Dans la ligne "consensus", c pour "chargé", n pour "non-polaire", p pour "polaire". Les acides aminés mutés dans **CadA_{LM}** sont en rouge et soulignés.

R.3.3 Le test phénotypique comme outil de prédiction.

Nous avons utilisé le phénotype de sensibilité au cadmium (Figure R1) comme moyen de prédire a priori, c'est-à-dire avant toute mesure directe de son activité, l'état de fonctionnalité d'un mutant de **CadA_{LM}**. Deux caractéristiques au moins, participent de la qualité du test phénotypique, sa reproductibilité et sa sensibilité.

Reproductibilité : Sur des cellules transformées par un vecteur centromérique (pRS316), c'est-à-dire présent à raison de 1 à 2 copies par cellule, le phénotype associé à l'expression de **CadA_{LM}** (sensibilité à 1 μ M de cadmium) a été reproduit pour 21 clones indépendants sur 22, clones issus de 9 transformations de la souche W303-1A. Dans ces conditions d'expression, on observe le même phénotype avec une protéine **CadA_{LM}** modifiée en C-terminal par addition d'un épitope HA (13 clones indépendants sur 14, issus de 2 transformations) ou par fusion à la GFP (2 clones indépendants sur 2, issus d'une transformation). Le phénotype associé à l'expression du mutant non fonctionnel **D398A** (croissance jusqu'à 100 μ M de cadmium) a été reproduit pour 20 clones indépendants sur 20, issus de 8 transformations. Comme pour **CadA_{LM}**, les modifications du mutant D398A par addition de l'épitope HA ou fusion à la GFP ne modifient pas le phénotype, obtenu pour 14 clones indépendants sur 14, issus de 2 transformations dans le cas de **D398A-HA**, et pour 2 clones indépendants sur 2, issus d'une transformation pour **D398A-GFP**. Le phénotype des cellules transformées par le vecteur centromérique vide (pRS316) (croissance jusqu'à 100 μ M de cadmium) a été obtenu pour 29 clones indépendants sur 29, issus de 9 transformations. De cette analyse « statistique », les phénotypes de sensibilité au cadmium associés à l'expression d'une ATPase fonctionnelle ou non apparaissent très reproductibles dans des conditions où le taux d'expression, déterminé par utilisation d'un vecteur centromérique (pRS316), est faible.

Qu'en est-il lorsque le taux d'expression, déterminé par l'utilisation d'un vecteur multicopie (2 μ), est élevé?

Le phénotype de sensibilité à 1 μ M de cadmium associé à l'expression de **CadA_{LM}** a été obtenu pour 2 clones indépendants sur 2 issus d'une transformation de la souche W303-1A et pour 18 clones indépendants sur 23, issus de 4 transformations

dans le cas de **CadA_{LM}-HA**. On peut donc constater une légère diminution de la reproductibilité du phénotype lorsque l'expression de **CadA_{LM}** est réalisée à partir d'un vecteur multicopie (2μ). Le phénotype de croissance jusqu'à 100 μM de cadmium associé à l'expression du mutant **D398A** a été obtenu pour 4 clones indépendants sur 4, issus de 2 transformations et pour 16 clones indépendants sur 16, issus de 3 transformations dans le cas de **D398A-HA**. Ce même phénotype a été obtenu avec le vecteur multicopie vide (2μ) pour 18 clones sur 18, issus de 4 transformations. Comme précédemment avec des vecteurs centromériques (pRS316), le phénotype associé à ces deux dernières conditions est parfaitement reproductible avec des vecteurs multicopie (2μ).

L'ensemble des tests rapportés précédemment montre que l'accroissement de la sensibilité au cadmium induit par expression d'une ATPase **CadA_{LM}** fonctionnelle est un phénomène globalement très reproductible.

Sensibilité : L'intérêt d'un test phénotypique comme outil de sélection est d'autant plus grand qu'il permet de déceler des différences fonctionnelles entre mutants. Il semble que cela soit le cas ici puisque l'expression d'une ATPase tronquée de sa région aminoterminal (Δ**MBD**) et dont le fonctionnement s'est avéré être altéré (Bal *et coll.*, 2001) conduit à un phénotype différent à la fois de celui de **CadA_{LM}** et de celui du mutant **D398A**, une sensibilité à 10 μM de cadmium. A partir d'un vecteur centromérique (pRS316), ce phénotype a été obtenu pour 4 clones indépendants sur 4, issus de 2 transformations de la souche W303-1A, 2 clones indépendants sur 2, issus d'une transformation dans le cas de Δ**MBD-HA** et 2 clones indépendants sur 2, issus d'une transformation dans le cas de Δ**MBD-GFP**. A partir d'un vecteur multicopie (2μ), ce phénotype a été obtenu pour 6 clones indépendants sur 6, issus de 3 transformations et pour 4 clones indépendants sur 4 dans le cas de Δ**MBD-HA**. Comme c'est le cas pour la protéine fonctionnelle **CadA_{LM}** et le mutant non-fonctionnel **D398A**, le phénotype associé à l'expression de Δ**MBD** est reproductible.

Sur la base de ses caractéristiques de reproductibilité et de sensibilité, le test de sensibilité au cadmium apparaît comme un révélateur fiable de l'état fonctionnel des variants de **CadA_{LM}**. Ainsi pourrions-nous classer les variants de **CadA_{LM}** en trois catégories : les variants fonctionnels ou de *type I*, les variants fonctionnels mais dont

certaines des propriétés enzymatiques sont altérées ou de *type II* et les variants non fonctionnels ou de *type III*.

R.3.4 Test phénotypique des mutants de CadA_{LM}

A ce jour, 30 mutants appartenant à des segments transmembranaires de la protéine **CadA_{LM}** ont été caractérisés par le test phénotypique de sensibilité au cadmium (Figure R7). La définition des trois types est donnée en haut de la figure par la sensibilité au cadmium de levures exprimant **CadA_{LM}**, **ΔMBD** ou **D398A**.

Parmi ces 30 mutants, 23 induisent une sensibilité de la levure à 0.1 μM de cadmium (*type I*), et ont probablement une activité enzymatique identique à celle de la protéine **CadA_{LM}**. Les acides aminés modifiés dans ces mutants ne seraient donc pas essentiels au cheminement du cadmium à travers la protéine. Quatre mutants **M149A**, **E164A**, **T684A**, **P355A** empêchent la levure de pousser au delà de 10 μM de cadmium. Ils s'agirait donc de mutants fonctionnels mais dont l'activité enzymatique serait altérée (*type II*). Enfin 3 mutants **C354A**, **C356A**, et **D692A** n'induisent pas une sensibilité accrue de la levure au cadmium et seraient donc non fonctionnels (*type III*).

En plus des mutations ponctuelles, le double-mutant **E164A/P355A** donne un résultat très intéressant puisque la combinaison de deux mutations de *type II* produit un mutant de *type III*, une protéine non fonctionnelle. Cela suggère une propriété d'additivité de l'effet de ces deux mutations qui renforce l'hypothèse selon laquelle ces deux acides aminés seraient impliqués dans la voie de passage du métal au sein de **CadA_{LM}**.

Chaque mutation de **CadA_{LM}** est a priori susceptible de modifier l'adressage de la protéine dans la levure, et par conséquent le phénotype. Nous avons donc cherché pour chacun des 7 mutants sélectionnés par le test phénotypique si la localisation dans la levure était différente de celle de la protéine sauvage. Des expériences similaires à celles décrites au paragraphe R.1.5 nous ont montré que les mutations situées selon les cas dans les hélices 3, 4, 6 ou 8 n'induisent pas de changement de

localisation de la protéine. Donc, seul un changement de fonctionnalité de **CadA_{LM}** peut expliquer le changement de sensibilité au cadmium qu'induisent les mutations.

		Cd 0	Cd 0.1 µM	Cd 1 µM	Cd 10 µM	Type de mutant
	CadA					I
	ΔMBD					II
	D398A					III

Segment Transmb.						
1	S92A					I
	S104A					I
2	T115A					I
	N116A					I
	S129A					I
	T144A					I
3	M145A *					I
	E146A					I
	T147A					I
	M149A					II
	T150A					I
	E164A					II
4	S166A					I
	S175 A					I
	E176A					I
	E179A*					I
	T329A					I
6	S348A					I
	C354A *					III
	P355A *					II
	C356A *					III
	S360A					I
	T362A					I
7	N663A *					I
	S667A					I
8	T684A					II
	M690A					I
	D692A					III
	M693A					I
	T696A					I
4/6	E164A/P355A					III

Figure R7 Classement des différents mutants de la protéine **CadA_{LM}**. Ce tableau est obtenu à partir du test phénotypique de sensibilité au cadmium. Chacun des mutants a été exprimé dans *S. cerevisiae* à l'aide d'un vecteur centromérique. Les acides aminés en gras sont prédits pour affecter lorsqu'ils sont mutés, le fonctionnement de **CadA_{LM}**. Les acides aminés indiqués par une étoile rouge sont communs à **CadA_{LM}** et aux ATPases-Cu⁺ ATP7A , ATP7B et Ccc2p .

R.3.5 Etude de CadA_{LM} et ses variants par protéolyse ménagée

Les 7 formes mutantes de la protéine ont été exprimées dans la levure et collectées sous forme d'extraits membranaires. La figure R8 montre la vérification par Western Blot de l'expression de ces mutants, qui sont exprimés avec un épitope HA en position C-terminale. Ce test montre que toutes les protéines mutées sont exprimées de façon comparable.

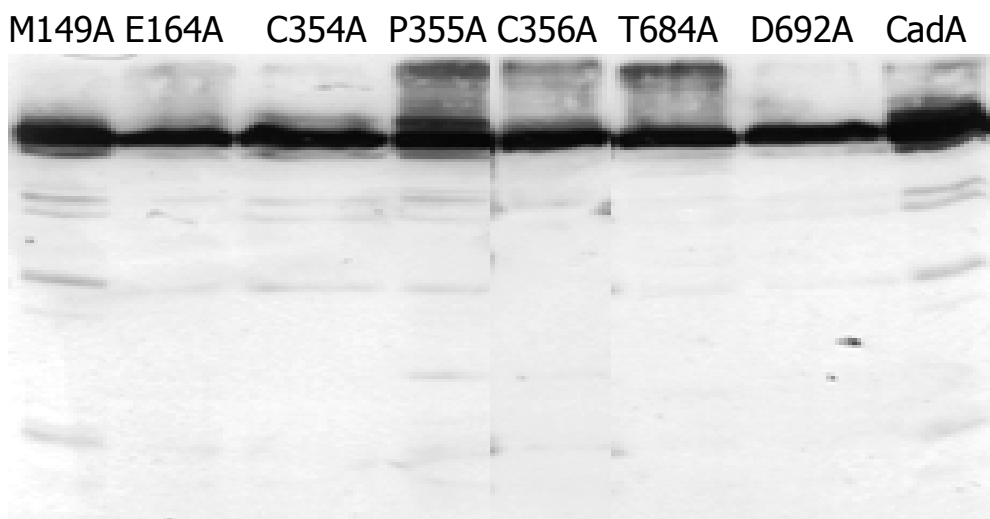


Figure R8. Western blot pour contrôler l'expression des formes mutantes de **CadA_{LM}** dans la levure.

Pour savoir si les mutations qui sont situées dans les segments transmembranaires ont affecté la conformation de **CadA_{LM}**, l'analyse de **CadA_{LM}** et ses mutants a été menée par trypsinolyse. L'expérience de trypsinolyse limitée (Figure R9) montre que les mutants **M149A**, **E164A**, **C354A**, **C356A**, **T684A** et **D692A** fixent l'ATP comme **CadA_{LM}** ou le mutant non fonctionnel **D398A**. La fixation d'ATP sur l'enzyme induit un changement de conformation qui masque des sites de trypsinolyse. Le profil révélé par Western Blot après digestion trypsique en présence d'ATP est donc différent de celui obtenu en absence d'ATP. La comparaison du profil de trypsinolyse de CadA avec ceux des mutants sélectionnés montre que tous présentent un site catalytique intact au niveau du domaine cytoplasmique. On

remarque également que la fixation de l'ATP a bien lieu en absence de métal. D'autres expériences nous ont montré que la présence de cadmium ne modifie pas le profil de trypsinolyse de la protéine et que la présence d'ADP et de métal, ou d'ADP seul induisent le même profil de trypsinolyse que la présence d'ATP.

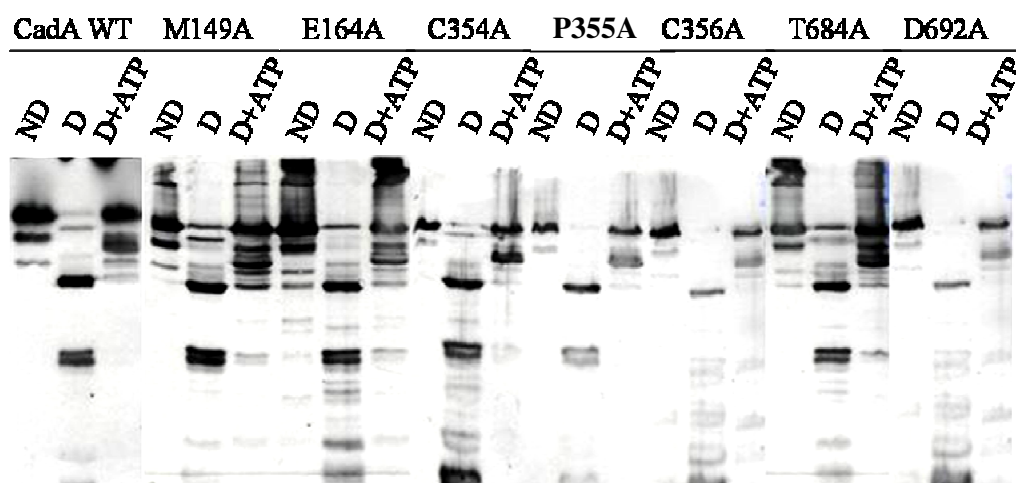


Figure R9, Trypsinolyse limitée de **CadA_{LM}** et ses mutants. **ND**, la protéine non-digérée. **D**, la protéine digérée par trypsine. **D+ATP**, la protéine digérée par trypsine en présence de l'ATP.

R.3.6 Analyse biochimique des mutants de **CadA_{LM}**

Nous avons poursuivi par l'analyse fonctionnelle de ces mutants. Les expériences biochimiques sont les mêmes que celles décrites plus haut (chapitre R2) pour **CadA_{LM}**. Les signaux révélant les dérivés phosphorylés sur les gels ont été quantifiés. Pour cela, nous avons utilisé des bandes provenant d'autres protéines de la levure et toujours présentes sur les gels pour normaliser les signaux de phosphorylation d'un gel à l'autre. Enfin, la valeur 0 est attribuée au signal venant de la phosphorylation par $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ en absence de cadmium ou au signal venant de la phosphorylation par ^{32}Pi en présence de 2 mM de cadmium. L'échelle de phosphorylation par ATP qui a été établie au chapitre R2 est conservée, la valeur 100% reste donc le maximum de phosphorylation de **CadA_{LM}**.

La figure R10 montre la phosphorylation par ATP de **CadA_{LM}** et ses mutants, la figure R11, la phosphorylation par Pi.

Nous allons analyser ces figures, selon le raisonnement déjà employé au chapitre R2 pour les affinités de **CadA_{LM}**, la protéine sauvage. Une caractéristique de plus, l'intensité du signal de phosphorylation par ATP nous permet de raisonner par rapport à la protéine sauvage, puisque la quantité totale de protéine exprimée est la même pour tous les mutants (Figure R8). D'autre part, nous pouvons exclure une modification par les mutations de la capacité des protéines à lier l'ATP (Figure R9). Les différences de phosphorylation observées selon les mutants (Figures R10 et R11) devraient donc nous permettre de raisonner en termes de modifications du site de transport.

La protéine sauvage a un site de haute affinité mis en évidence par l'inhibition de la phosphorylation par Pi en présence de 1 μM de Cd^{2+} et par la phosphorylation par ATP à 10 μM de Cd^{2+} . De plus, le niveau de phosphorylation par ATP augmente considérablement entre 100 et 500 μM de Cd^{2+} parce que ces concentrations bloquent la dissociation du Cd^{2+} fixé au dérivé phosphorylé, étape qui devient alors limitante (●). Ainsi une augmentation du niveau de phosphorylation d'un mutant par rapport à **CadA_{LM}** peut révéler une difficulté à dissocier le cadmium du dérivé phosphorylé du mutant. En effet, le cadmium, s'il reste occlus au site de transport, empêche la déphosphorylation de l'enzyme.

La très faible intensité des signaux de phosphorylation par ATP (Figure R10) de **M149A** (○), **C354A** (▽), **P355A** (■) et **D692A** (◇) entre 10 μM et 1 mM de Cd^{2+} suggère que ces mutations empêchent la phosphorylation par l'ATP de se produire. Pour savoir si le site de transport a toujours une haute affinité, comme celui de la protéine sauvage, il faut regarder la réponse au Cd^{2+} de la phosphorylation par Pi (Figure R11). On observe 3 réponses différentes : la phosphorylation par Pi de **M149A** est inhibée par 10 μM de Cd^{2+} , alors que celle de **C354A** est insensible au Cd^{2+} , et ce jusqu'à 1 mM. Enfin, **P355A** et **D692A** ne sont pas phosphorylables par Pi.

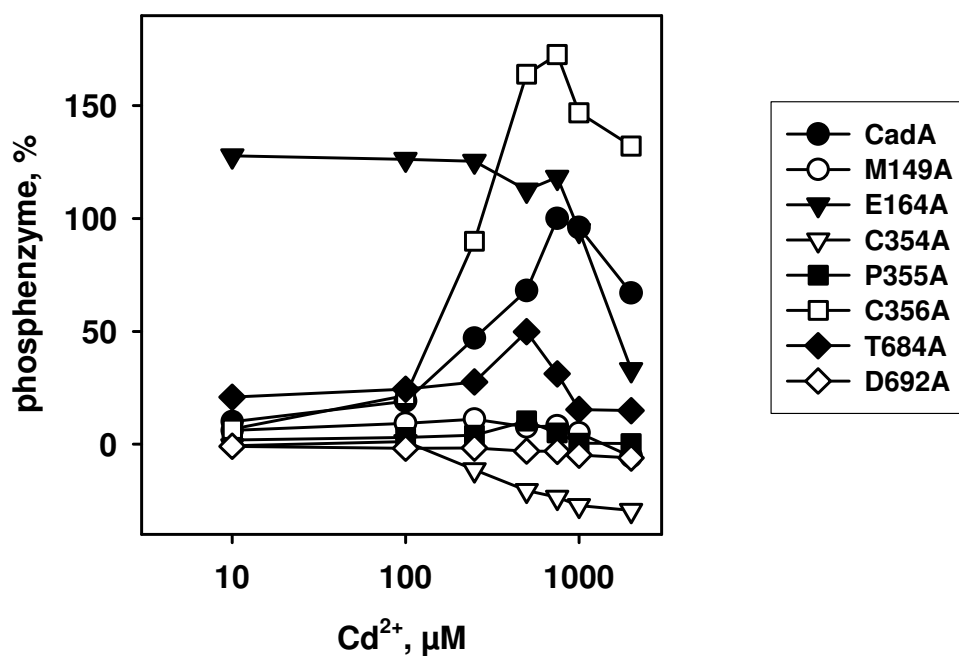


Figure R10, La phosphorylation des mutants de **CadA_{LM}** par l'ATP radioactif en fonction de la concentration de cadmium.

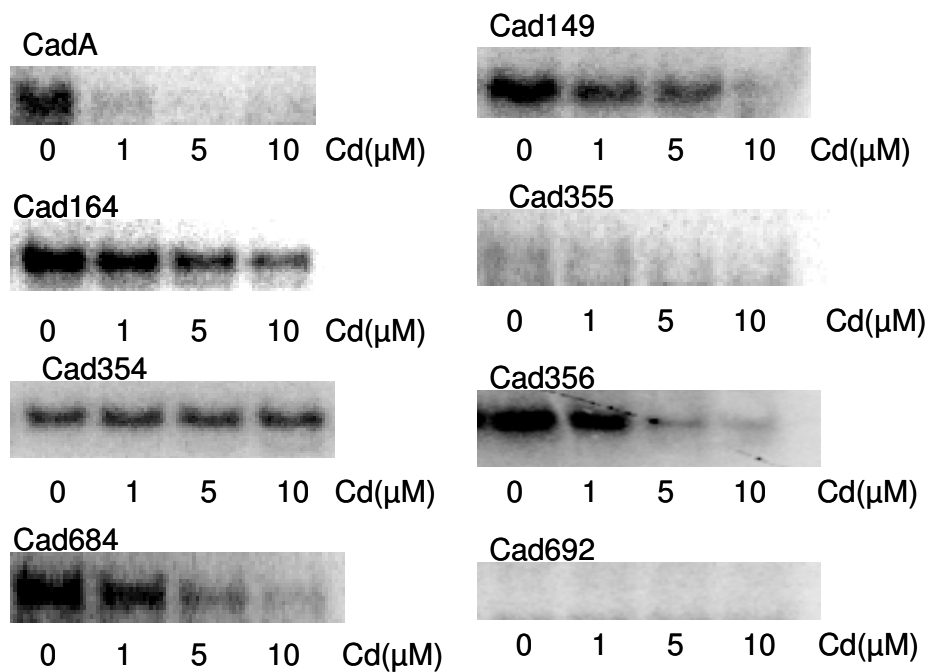


Figure R11 La phosphorylation des mutants de **CadA_{LM}** par le Pi radioactif en fonction de la concentration de cadmium

Parmi les autres mutants, **T684A** (◆) et **C356A** (□) présentent le même profil de phosphorylation par l'ATP que la protéine sauvage (●), avec cependant une grande disparité dans l'intensité du signal. Le site de haute affinité a une moins bonne affinité puisque la phosphorylation par Pi est inhibée par 10 μM de Cd^{2+} . Par contre, la variation d'intensité du signal de phosphorylation suggère que les mutations affectent l'étape de dissociation du Cd^{2+} ou bien la déphosphorylation des protéines mutées. Plus ces étapes sont lentes, plus le dérivé phosphorylé s'accumule, comme dans le cas de **C356A**.

Enfin, le mutant **E164A** (▼) présente un profil de phosphorylation par l'ATP très différent des autres. Toute la protéine est phosphorylée par l'ATP en présence de 10 μM de Cd^{2+} et la phosphorylation par Pi est inhibée par 10 μM de Cd^{2+} . La différence avec **CadA_{LM}** réside essentiellement dans l'absence de stimulation de la phosphorylation par l'ATP à haute concentration de Cd^{2+} . Le site de haute affinité, vu par le Pi, ne semble pas très différent de celui de la protéine sauvage. Ce profil s'explique si l'on suppose que l'effet de la mutation est de rendre limitante la désocclusion du Cd^{2+} à partir du dérivé phosphorylé, indépendamment de la concentration de Cd^{2+} .

Soit en résumé :

- **M149** (*phénotype II*) n'appartient pas directement au site de haute affinité, mais participe à une étape essentielle entre la fixation du Cd^{2+} et la phosphorylation par l'ATP
- **C354** (*phénotype III*) appartient au site de transport de haute affinité, car sa mutation fait perdre à la fois la possibilité d'être phosphorylé par l'ATP et l'inhibition de la phosphorylation par Pi en présence de Cd^{2+}
- **P355** (*phénotype II*) et **D692** (*phénotype III*) sont essentiels puisque leur mutation empêche de phosphoryler la protéine
- **T684** (*phénotype II*), **C356** (*phénotype III*) et **E164** (*phénotype II*) n'appartiennent pas directement au site de haute affinité, mais ont un rôle dans la désocclusion du Cd^{2+} à partir du dérivé phosphorylé.

Ces simples comparaisons des gammes de concentration efficaces pour phosphoryler par l'ATP ou inhiber la phosphorylation par Pi nous fournissent une première

hypothèse du rôle des acides aminés que nous avons sélectionnés par le phénotype de sensibilité au Cd^{2+} induit dans la levure par **CadA_{LM}** sauvage ou mutée. La relation entre ces expériences et le phénotype observé in vivo sera discutée plus loin.

R.4 Chimères d'ATPases

R.4.1 Chimères de grandes boucles

A la question de l'identification des sites de transport des ATPases de type P_I s'ajoute celle de la régulation de l'activité de transport elle-même. En effet, s'il est possible comme nous venons de le montrer, d'affecter voire même de bloquer cette activité par des mutations d'acides aminés situés dans la région transmembranaire de la protéine, nous avons aussi montré que la région aminoterminal de **CadA_{LM}** pouvait moduler l'accessibilité du site de transport (Bal *et coll.*, 2003) et ainsi exercer un rôle régulateur sur l'activité de transport (Bal *et coll.*, 2001). Il semblait peu probable que la région cytoplasmique de **CadA_{LM}** puisse interagir directement sur le site de transport lui-même. En revanche, un article de (Tsivkovskii *et coll.*, 2001) montrait que le domaine N-terminal de l'ATPase Wilson pouvait interagir avec une partie de la grande boucle cytoplasmique de la protéine et que cette interaction était modulée par le cuivre. Ceci nous a conduit à débiter une étude sur des chimères d'ATPases dans lesquelles la partie cytoplasmique de **CadA_{LM}** a été remplacée par celle de l'ATPase-Cu⁺ Ccc2p (ATPase de type P_I) ou de l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a (ATPase de type P_{II}) (Figure R12)

R4.1.1 Analyse phénotypique des chimères produites dans la levure

Selon la stratégie déployée pour l'étude des mutants membranaires de **CadA_{LM}**, les gènes chimériques ont été sous-clonés dans le vecteur centromérique (pRS316) pour réaliser des tests de sensibilité au cadmium. Comme le montre la figure R13 la chimère contenant la grande boucle cytoplasmique de Ccc2p induit la même létalité à 1 µM de Cd²⁺ que **CadA_{LM}**. Le remplacement effectué n'affecte donc pas la sélectivité, ni l'efficacité de **CadA_{LM}**. En revanche, la chimère contenant la grande boucle cytoplasmique de SERCA1a apparaît comme une ATPase **CadA_{LM}** non fonctionnelle.

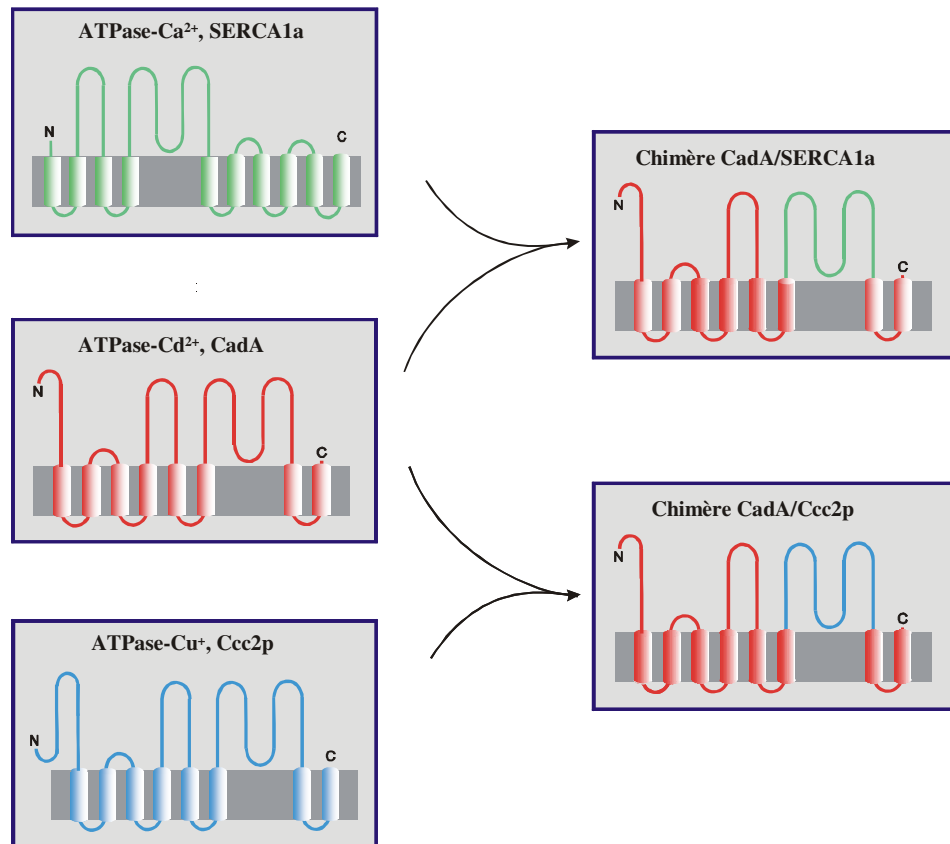


Figure R12. Vue schématique des chimères du domaine cytoplasmique. La grande boucle de **CadA_{LM}** est remplacée par la grande boucle de l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a (en vert) ou par celle de l'ATPase-Cu⁺ Ccc2p (en bleu).

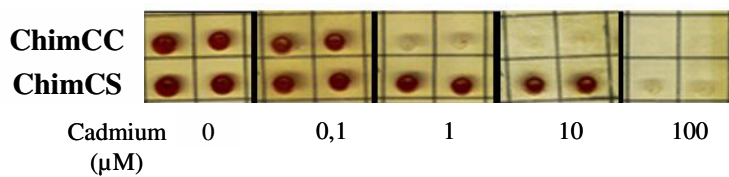


Figure R13. Phénotype associé à l'expression des chimères.

ChimCC : chimère **CadA_{LM}** /Ccc2p, ChimCS : chimère **CadA_{LM}** /SERCA1a. 2 clones indépendants sont analysés pour chaque chimère

R4.1.2 Immunodétection des ATPases chimériques

La présence des ATPases hybrides a été détectée dans des préparations de membranes totales de levure, au moyen d'un anticorps anti-HA selon le même principe que celui appliqué pour l'analyse des mutants membranaires. Des anticorps spécifiques des domaines cytoplasmiques de SERCA1a ou Ccc2p ont été aussi utilisés (Figure R14).

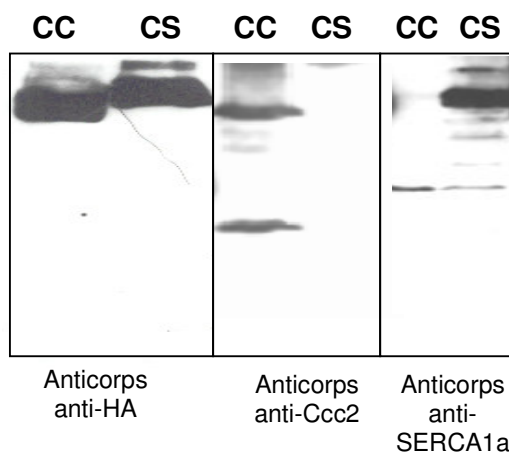


Figure R14. Immunodétection des chimères à l'aide d'anticorps spécifiques. Les chimères sont exprimées dans la levure à partir de vecteurs multicopies. La différence de taille entre les deux chimères s'explique par la différence de taille entre les grandes boucles de SERCA1a et Ccc2p, la première comprenant 357 acides aminés, la seconde 216.

R4.1.3 Analyse fonctionnelle des chimères

Des expériences de phosphorylation par l'ATP ont été utilisées pour tester la fonctionnalité des deux ATPases chimériques produites dans la levure. Comme le montre la figure R15, la chimère contenant la grande boucle cytoplasmique de ATPase-Cu⁺ Ccc2p peut être phosphorylée par l'ATP en présence de cadmium. Elle est donc fonctionnelle comme le suggérait le test phénotypique. La chimère contenant la grande boucle cytoplasmique de ATPase-Ca²⁺ SERCA1a ne montre

quant à elle aucun signal de phosphorylation, ce qui confirme là encore le test phénotypique.

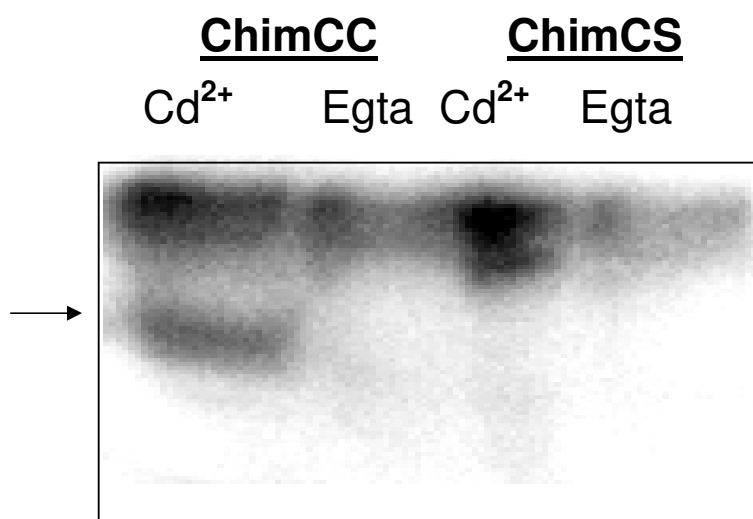


Figure R15. Phosphorylation des chimères par l'ATP. L'expérience est réalisée sur une préparation de membranes totales de levure en présence de 1 μM de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ et de 30 μM de Cd^{2+} ou 500 μM d'EGTA.

R.4.2 Chimères des domaines N et P de CadA_{LM}

Nous venons de montrer que les grandes boucles de **CadA_{LM}** et de Ccc2p sont interchangeable. Ce n'est en revanche pas le cas pour les grandes boucles de **CadA_{LM}** et de SERCA1a. Ces trois grandes boucles qui viennent d'ATPases de sélectivités ioniques différentes n'en possèdent pas moins les mêmes modules fonctionnels, un domaine de phosphorylation (P) et un domaine de liaison du nucléotide (N). Pour savoir plus précisément quel domaine est essentiel pour la conservation de l'activité de **CadA_{LM}** , des chimères de **CadA_{LM}** contenant le domaine de phosphorylation (P) ou le domaine nucléotidique (N) de Ccc2p ou de SERCA1a ont été réalisées (Figure R16).

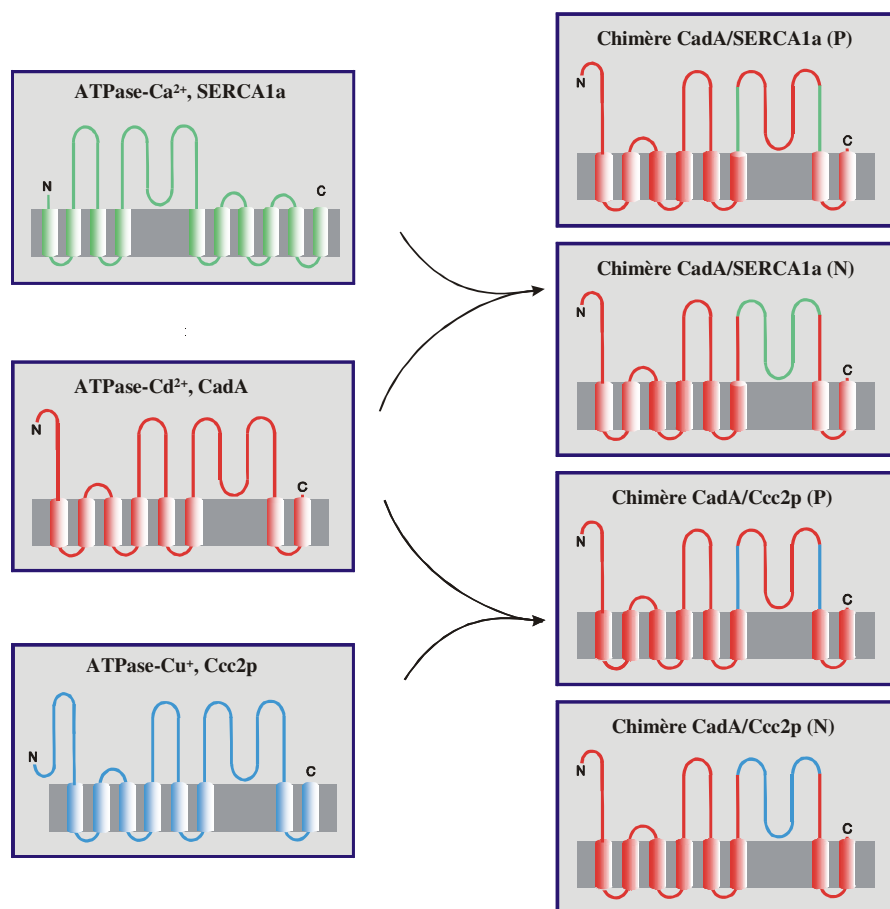


Figure R16. Chimères des domaines N et P de **CadA_{LM}**.

Les test phénotypiques de la figure R17 montrent que les chimères contenant le domaine de phosphorylation de Ccc2p ou de SERCA1a sont actives. On remarquera cependant que les deux chimères ne sont pas tout à fait équivalentes sur le plan fonctionnel puisque celle qui contient le site de phosphorylation de Ccc2p a une réponse phénotypique identique à celle de **CadA_{LM}**, alors que la chimère qui contient le site de phosphorylation de SERCA1a peut être classée comme un mutant de *type II*. En revanche, les chimères contenant le site nucléotidique de Ccc2p ou de SERCA1a apparaissent comme des ATPases **CadA_{LM}** inactives (*type III*).

En conclusion, l'interchangeabilité des modules constituant la grande boucle cytoplasmique semblent ne pouvoir s'appliquer qu'aux domaines de phosphorylation.

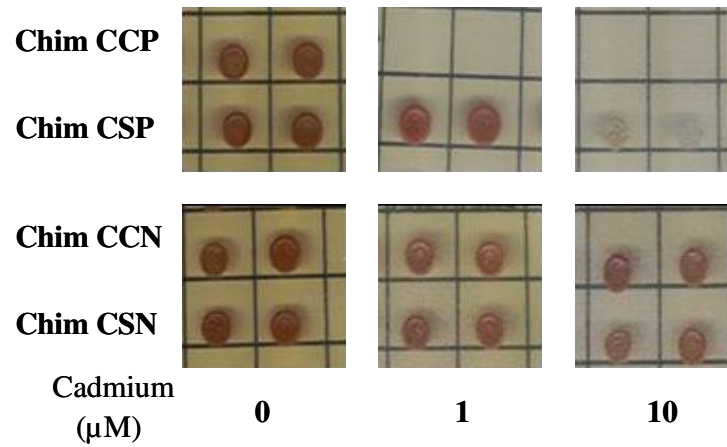


Figure R17. Phénotype des chimères des domaines N et P.

Chimères du domaine P : ChimCCP : chimère **CadA_{LM}** /Ccc2p; ChimCSP : chimère **CadA_{LM}** /SERCA1a. *Chimères du domaine N* : ChimCCN : chimère **CadA_{LM}** /Ccc2p; ChimCSN : chimère **CadA_{LM}** /SERCA1a. Deux clones indépendants sont analysés pour chaque chimère

Discussion

Le cadmium qui n'a aucun rôle physiologique est un élément rare très soluble présent à des concentrations proches de 1 nM dans l'environnement. Sa toxicité, le Cd^{2+} la doit à sa capacité à remplacer certains métaux physiologiques comme Zn^{2+} et Ca^{2+} , à interagir avec les groupements thiols des protéines provoquant l'inhibition de certaines enzymes, à générer une peroxydation des lipides et à indirectement créer un stress oxydant par exemple par épuisement des antioxydants naturels de la cellule comme le glutathion (Nelson, 1999; Nies, 2003).

La résistance au Cd^{2+} fait intervenir deux mécanismes cellulaires que l'on trouve fréquemment dans les phénomènes de résistance aux métaux lourds. L'un est la séquestration, l'autre l'exportation. Une fois dans la cellule, le Cd^{2+} est séquestré par les groupements thiols de diverses molécules pour former des complexes non toxiques. La formation de complexes chez *S. cerevisiae* met en jeu le *glutathion* et les *thiorédoxines* (Eide, 2001), deux systèmes réducteurs des thiols des cellules. Cependant, le coût énergétique de cette complexation étant très élevé, la formation de complexes n'est une voie efficace de détoxification que pour des cellules exposées à de faibles concentrations en métaux lourds. Chez la levure, le Cd^{2+} est stocké dans la vacuole, par un phénomène actif impliquant une protéine de la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette). Chez des procaryotes exposés à de hautes concentrations en Cd^{2+} , le mécanisme de résistance le plus efficace est l'exportation des ions hors du cytoplasme. Ceci met en jeu principalement **CadA_{LM}** ou ses homologues qui se trouvent dans la plupart des organismes vivant dans un environnement contaminé par le Cd^{2+} (Oger *et coll.*, 2001). Délimitées par des séquences de transposition, les gènes codant pour **CadA_{LM}** et ses homologues peuvent circuler entre les différents organismes procaryotes. C'est un des mécanismes d'acquisition de la résistance aux métaux lourds, mais aussi aux antibiotiques. Néanmoins, l'expression de **CadA_{LM}** dans la levure augmente la sensibilité de la cellule au Cd^{2+} , cet effet résultant probablement de la localisation de **CadA_{LM}** au niveau du réticulum endoplasmique. On peut supposer que par un phénomène de transposition analogue à celui existant chez les procaryotes, le gène *CadA* puisse intégrer un génome eucaryote et créer un phénomène de toxicité. Ce

phénomène pourrait ne pas dépendre de la seule présence de Cd mais exister indépendamment de tout métal ajouté. En effet, nous avons constaté que la croissance de la levure exprimant **CadA_{LM}** fonctionnelle en absence de Cd²⁺ est beaucoup plus faible que celle de la levure exprimant **CadA_{LM}** non-fonctionnelle.

CadA_{LM} dans un vecteur approprié permet à *L. monocytogenes* et à *B. subtilis* de résister à des concentrations en cadmium de 512 et 256 µM, respectivement, au lieu des 16 et 8 µM observés lorsque les gènes sont absents. Dans les mêmes conditions expérimentales, **CadA_{LM}** ne confère à ces cellules aucune résistance au zinc et au plomb. Chez la levure, la présence de **CadA_{LM}** ne confère pas non plus de sensibilité accrue à ces deux métaux. Pourtant, des mesures d'activité ATPase, de transport, et de phosphorylation par ATP et Pi ont montré que zinc et plomb peuvent être substrats de **CadA_{LM}**. L'absence de sensibilité à ces deux métaux, observée à la fois dans les souches procaryotes dépourvues du gène **CadA_{LM}** et *S. cerevisiae* exprimant ce même gène peut probablement s'expliquer en partie par les caractéristiques propres du zinc et du plomb. Le zinc est un métal physiologique, de toxicité faible, avoisinant chez *E. coli* celle du cuivre ou du cobalt. Sa toxicité chez l'homme pourrait s'expliquer par un effet sur l'homéostasie du cuivre (Nies, 1999). Le zinc est le composant métallique majeur d'une grande variété d'enzymes et de protéines liant l'ADN, comme les protéines à doigts de zinc. Son rôle physiologique prépondérant implique une régulation fine de son homéostasie. Ainsi chez *L. monocytogenes* comme chez *B. subtilis*, la présence d'une seconde ATPase de type P₁ ou d'un transporteur de la famille des protéines CDF (cation diffusion facilitator) pourrait fonctionnellement compenser l'absence d'un gène CadA (Nies, 2003). Chez *S. cerevisiae*, où sa toxicité est faible (CMI > 1 mM), le zinc influe par lui-même sur son influx dans la cellule, via une régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle des transporteurs de la membrane plasmique Zrt1p et Zrt2p. Il est possible que cette régulation située en amont de l'activité de CadA ait empêché l'observation d'une toxicité au zinc induite par la présence de CadA. Quant au plomb, c'est un élément rare et faiblement soluble, ce qui explique qu'il soit beaucoup moins toxique pour les microorganismes que le cadmium. A titre d'exemple, alors que pour *S. cerevisiae*, la CMI pour le cadmium est de 150 à 200 µM, elle est de 50 mM pour le plomb (Gravot et coll., 2004).

Comme nous l'avons mentionné au chapitre R.1.3, on distingue dans la famille des ATPases de type P_{IB}, les ATPases-Cd²⁺, Zn²⁺ ou Pb²⁺ des ATPases-Cu⁺ ou Ag⁺. Dans son travail de thèse, Nathalie Bal a montré au laboratoire que le Co²⁺ est aussi un substrat pour **CadA_{LM}** produite grâce au système baculovirus/Sf9 (Bal, 13 décembre 2002). Une étude récente sur la protéine ZntA de *E. coli* a élargi la gamme de métaux susceptibles d'être substrats des ATPases-Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺ ou Co²⁺ au Ni²⁺ et au Cu²⁺ (Hou et Mitra, 2003). Néanmoins, nos expériences de phosphorylation par l'ATP sur l'ATPase **CadA_{LM}** produite dans la levure montre que seuls Cd²⁺, Zn²⁺ et Pb²⁺ (et non pas Co²⁺, Ni²⁺, ni Cu²⁺) sont substrats de **CadA_{LM}**. Ceci montre que selon l'organisme dans lequel on l'exprime (baculovirus/Sf9 versus *S. cerevisiae*), **CadA_{LM}** peut avoir des propriétés différentes, et que bien que classées dans la même famille P_{IB}, **CadA_{LM}** et ZntA ont des spécificités ioniques différentes.

Des expériences réalisées sur ZntA, l'ATPase-Zn²⁺, Cd²⁺ ou Pb²⁺ de *E. coli* et CopA, l'ATPase-Cu⁺ de *Archaeoglobus fulgidus* ont montré un effet de la présence de groupements thiols, apportés sous forme de cystéine ou de glutathion ajoutés au milieu réactionnel, sur l'activité ATPase (Sharma *et coll.*, 2000; Mitra et Sharma, 2001; Mandal *et coll.*, 2002). Ce type d'expérience avait pour but de se rapprocher de conditions physiologiques où l'on suppose que le métal n'est jamais libre dans la cellule (Rae *et coll.*, 1999). Toutefois comme le font remarquer Mandal et collaborateurs (Mandal *et coll.*, 2002), la concentration de cystéine à ajouter pour obtenir une activation maximale de **CopA_{AF}** est 200 fois celle du métal. Compte tenu de la valeur de la constante de dissociation du complexe cystéine/argent (10⁻²⁰ M), la présence du complexe thiolate/métal ne serait pas seul responsable de l'activation maximale de la protéine. Pour éviter de rentrer dans cette problématique, nous avons préféré réaliser les expériences de caractérisation fonctionnelle de **CadA_{LM}** en absence de tout ajout de thiols au milieu réactionnel. Ce choix ne nous éloigne peut-être pas énormément des conditions physiologiques dans lesquelles **CadA_{LM}** travaille puisque comme la plupart des bactéries à Gram⁺, *L. monocytogenes* ne produit pas de glutathion ni d'équivalents de type mycothiols.

Le cadmium, substrat métallique de **CadA_{LM}**, peut être considéré comme un véritable poison pour la cellule. Les données bibliographiques montrent que le

cadmium peut inhiber les transporteurs membranaires selon trois mécanismes. Le premier n'est pas spécifique des transporteurs membranaires et fait intervenir la réactivité du cadmium avec les groupements thiols conduisant à une dénaturation structurale des protéines. Le second, mis en évidence sur l'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a, fait intervenir certaines similarités entre Ca^{2+} et Cd^{2+} (par exemple au niveau de rayon ionique, 0.097 nm pour le Cd^{2+} , 0.099 nm pour le Ca^{2+}). Cette similarité, que l'on retrouve par exemple dans la capacité du Cd^{2+} à se lier à la calmoduline, conduit à une inhibition de l'ATPase- Ca^{2+} par liaison du Cd^{2+} aux sites de transport. Le troisième mécanisme révélé dans une étude portant sur l'ATPase- Ca^{2+} de la membrane plasmique, implique le Cd^{2+} dans une inhibition compétitive avec le Mg^{2+} . Il s'agit là non plus d'un effet du Cd^{2+} sur les sites de transport de l'ATPase mais sur le site nucléotidique où le complexe CdATP agirait comme inhibiteur compétitif du complexe MgATP. Le travail que nous exposons dans le deuxième chapitre des résultats montre que **CadA_{LM}** reste fonctionnelle à de très hautes concentrations de Cd^{2+} (jusqu'à 500 μM). Cela peut s'expliquer d'une part par la particularité de la séquence primaire de **CadA_{LM}** qui ne contient que 4 cystéines, toutes impliquées dans la fixation du Cd^{2+} . Les deux cystéines du domaine membranaire, Cys354 et Cys356, participent au site de transport du Cd^{2+} , les deux autres, Cys14 et Cys17, forment le site de fixation du Cd^{2+} dans le domaine N-terminal, domaine dont la fonction reste encore mal définie.

Comme nous l'avons montré au chapitre R.1.3, l'activité ATPase ainsi que le dérivé phosphorylé de **CadA_{LM}** peuvent être obtenus en utilisant le CdATP comme substrat. La phosphorylation de **CadA_{LM}** par l'ATP en présence de Zn^{2+} ou de Pb^{2+} et en absence de Mg^{2+} montre aussi que ZnATP et PbATP peuvent être substrats de **CadA_{LM}**. Ceci suggère que la phosphorylation de **CadA_{LM}** par l'ATP est sélective au niveau des ions à transporter, mais pas au niveau du substrat qui peut être CdATP, ZnATP ou PbATP, en plus de MgATP. D'autre part, nous n'avons pas jusqu'ici mis en évidence d'effet propre au Mg^{2+} sur le cycle de **CadA_{LM}**. Ceci demanderait des expériences supplémentaires.

L'ATP est connu pour être un chélateur efficace de certains ions divalents comme le Cd^{2+} ou le Zn^{2+} , mais aussi le Mg^{2+} et le Ca^{2+} (plusieurs études ont été réalisées

sur les complexes métalATP, spécialement MgATP, considéré comme le vrai substrat des ATPases de type P). Si en solution, l'ATP complexe inévitablement ces ions divalents, il est difficile de conclure que seul le complexe métalATP et non l'ATP lui-même est le substrat des ATPases de type P. Cette difficulté est particulièrement frappante chez **CadA_{LM}**, ATPase pour laquelle la présence de Mg²⁺ généralement considéré comme un activateur des ATPases de type P, n'est pas indispensable. L'examen des résultats obtenus sur l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a concernant ce sujet, révèle la difficulté à contrôler indépendamment la concentration de l'un des quatre éléments principaux de la réaction (Ca²⁺, Mg²⁺, MgATP et CaATP) lorsque la concentration de Mg²⁺ ou d'ATP est modifiée.

La dépendance en Cd²⁺ de la phosphorylation de **CadA_{LM}** est représentée par une courbe qui passe par un premier plateau révélant une haute affinité (meilleure que 10 µM) et une basse affinité aux alentours de 250 µM. La dépendance en Cd²⁺ de la phosphorylation par le phosphate inorganique fournit elle aussi, si l'on se réfère au modèle E1-E2, une information sur le site de transport. L'affinité apparente pour le Cd²⁺ extraite de la phosphorylation par Pi est de l'ordre de 1 µM, en accord avec le plateau observé en ATP.

On peut supposer, comme c'est le cas pour SERCA1a, que deux Cd²⁺ sont nécessaires à la phosphorylation par l'ATP de **CadA_{LM}** et qu'un seul Cd²⁺ suffit à inhiber la phosphorylation par Pi. Selon cette hypothèse, **CadA_{LM}** posséderait deux sites de transport fixant le Cd²⁺ dans le domaine transmembranaire, l'un de haute affinité révélé par l'inhibition de la phosphorylation par Pi, l'autre de basse affinité qui rendrait compte de la dépendance au Cd²⁺ de la phosphorylation de **CadA_{LM}** par l'ATP. Ces deux sites devraient donc être anti-coopératifs, contrairement aux sites Ca²⁺ de SERCA1a. Dans ce cas, le plateau observé à 10 µM de Cd²⁺ ne pourrait exister que si la phosphorylation par l'ATP est possible avec un seul site occupé. Ce qui est en contradiction avec le modèle communément admis pour les ATPases de type P. Notre préparation ne nous permet pas d'évaluer le nombre de sites de transport de **CadA_{LM}**, le seul argument en faveur de deux sites étant que nous avons mis en évidence 7 acides aminés membranaires susceptibles d'être impliqués dans

le transport du Cd^{2+} . Nous préférons donc l'hypothèse selon laquelle **CadA_{LM}** n'a qu'un seul site de transport de haute affinité, révélé par le plateau à 10 μM de la phosphorylation par l'ATP et par l'inhibition de la phosphorylation par le P_i . La stimulation de la phosphorylation par l'ATP entre 100 et 500 μM de Cd^{2+} serait due à l'inhibition de la dissociation du Cd^{2+} fixé au dérivé phosphorylé.

Une autre explication serait que le domaine N-terminal de **CadA_{LM}**, qui a la capacité de lier un Cd^{2+} , soit impliqué dans cette dépendance en Cd^{2+} de la phosphorylation par l'ATP. Un rôle du domaine N-terminal dans le fonctionnement des ATPases P_i a été suggéré par la mise en évidence d'une interaction dépendante du Cu^+ entre les domaines N-terminal et nucléotidique de l'ATPase- Cu^+ humaine (Tsivkovskii *et coll.*, 2001). Bien que nous n'ayons pas au cours de ce travail, examiné directement son rôle, il est tentant de spéculer sur un rôle éventuel du domaine N-terminal dans la régulation de l'activité de **CadA_{LM}**. Une concentration élevée de Cd^{2+} permettrait la fixation du Cd^{2+} au domaine N-terminal de **CadA_{LM}**. La fixation du Cd^{2+} provoquerait la dissociation du domaine N-terminal et du domaine nucléotidique (N), qui faciliterait l'accès du Cd^{2+} aux sites de transport. La concentration de cadmium est donc supposée avoir un rôle régulateur dans l'activité de **CadA_{LM}**.

Cette supposition est en accord avec nos résultats précédents qui ont démontré que **CadA_{LM}** tronquée de son domaine N-terminal (ΔMBD) possède une affinité apparente 3 fois plus élevée pour le Cd^{2+} que la protéine entière (Bal *et coll.*, 2001). Une observation similaire a été faite pour ZntA par Mitra *et coll.* qui ont montré que le Cd^{2+} est un meilleur substrat pour la protéine dépourvue de son domaine N-terminal que pour la protéine entière (Mitra et Sharma, 2001).

Les résultats des mutations dans le domaine transmembranaire suggèrent que quatre hélices, les hélices 3, 4, 6 et 8 pourraient participer au site de transport du cadmium dans l'ATPase **CadA_{LM}**. Ce sont aussi quatre hélices, les hélices 4, 5, 6 et 8 qui constituent le site de transport du calcium dans l'ATPase SERCA1a (Toyoshima *et coll.*, 2000), et qui sont essentielles au pompage du proton dans l'ATPase- H^+ de *Neurospora* (Kuhlbrandt *et coll.*, 2002).

Il est évident que ce n'est pas le seul besoin en coordination de l'ion qui a dicté cette conservation du nombre d'hélices impliquées dans le processus de transport. Au sein d'une ATPase de type P existe un couplage étroit entre l'hydrolyse de l'ATP qui se produit au niveau de la grande boucle cytoplasmique et le cheminement de l'ion au niveau de la région transmembranaire. Quatre doit être le nombre d'hélices requises pour ce couplage. Il est probable que des mutations affectant les acides aminés directement impliqués dans la coordination du métal abolissent complètement le fonctionnement de la protéine alors que des mutations affectant des acides aminés impliqués dans le couplage ne font qu'altérer le fonctionnement de la protéine. C'est peut-être de cette manière que dans le cas de **CadA_{LM}**, nous pouvons interpréter l'obtention de mutants de *type III*, non-fonctionnels et de *type II*, moins fonctionnels.

Notre étude montre que les mutants **C354A** et **C356A** du motif CPC et **D692A** du 8^{ème} segment transmembranaire sont des mutants de *type III*. Ceci suggère un rôle essentiel de ces trois acides aminés dans le transport du cadmium par **CadA_{LM}**.

Concernant les cystéines 354 et 356, des résultats similaires venant conforter nos conclusions ont été obtenus sur des ATPases-Cu⁺. Ainsi, les mutations du motif CPC de l'ATPase CUA-1 de *C. elegans* en CPA (Yoshimizu *et coll.*, 1998), CPC de l'ATPase Wilson humaine en SPS (Forbes et Cox, 1998), CPH de l'ATPase CopB d'*E. hirae* en SPH (Bissig *et coll.*, 2001) et CPC de l'ATPase Ccc2 de *S. cerevisiae* en SPC et CPS (Lowe *et coll.*, 2004), semblent-elles aux vues de tests phénotypiques, supprimer totalement l'activité de ces protéines. Les cystéines du motif CPC seraient donc des acides aminés essentiels non seulement pour **CadA_{LM}** mais pour les ATPases de type P_I en général. Cependant, sur Ccc2 comme sur **CadA_{LM}**, il semblerait au vu de tests fonctionnels, que les cystéines n'aient pas des rôles équivalents. Dans le motif CPC, la mutation de la proline 355 (mutant de *type II*) semble affecter sans la supprimer totalement l'activité de **CadA_{LM}**. Il est intéressant de noter que cette proline est présente au même endroit dans toutes les ATPases de type P. Sur l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a, sa mutation affecte le fonctionnement de l'enzyme (Vilsen *et coll.*, 1989). Si ses propriétés chimiques ne font pas de la proline un acide aminé susceptible d'interagir directement avec l'ion à

transporter, elle pourrait néanmoins avoir un rôle important dans la conformation du site de transport. C'est ce que suggèrent aussi nos résultats pour **CadA_{LM}**.

Concernant l'acide aspartique D692, il s'agit là d'un résultat tout à fait nouveau. Il est intéressant de noter que dans ce 8^{ème} segment transmembranaire a été aussi identifié un mutant de *type II*, le mutant **T684A**. Ces deux résultats suggèrent un rôle important de ce segment transmembranaire dans le fonctionnement de **CadA_{LM}** et peut-être dans le fonctionnement des ATPases de type P_I en général. En effet, la comparaison des segments transmembranaires de 73 ATPases de type P_I bactériennes révèle que c'est le 8^{ème} segment transmembranaire qui porte les divergences de séquence les plus marquées entre ATPases de spécificité ioniques différentes. Selon l'hypothèse avancée plus haut, le fait que le mutant **D692A** soit un mutant de *type III* pourrait signifier que l'acide aspartique 692 intervient directement dans la coordination du métal. Une étude récente portant sur le domaine N-terminal de fixation des métaux de ZntA d'*E. coli* apporte un argument en faveur de cette proposition (Banci *et coll.*, 2002). Les auteurs suggèrent en effet que si les deux cystéines conservées dans ces domaines sont directement impliquées dans la liaison du métal, c'est la présence ou l'absence d'un troisième acide aminé donneur de coordination qui module leur sélectivité ionique. En d'autres termes, les séquences GMTCCxxC ne pourraient donner que deux coordinations et donc ne lier que des ions comme Cu⁺, Ag⁺ ou Hg²⁺ alors que les séquences GMDCCxxC pourraient donner plus de deux coordinations et donc lier des métaux comme le zinc ou le cadmium. Un tel raisonnement pourrait s'appliquer non seulement à **CadA_{LM}** mais au site de transport des ATPases de type P_I en général. En effet, la comparaison des 8^{èmes} segments transmembranaires de 73 ATPases bactériennes montre qu'un acide aspartique équivalent au D692 de **CadA_{LM}** est conservé dans toutes les ATPases-Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺ connues à ce jour. A la position correspondante dans les ATPases-Cu⁺ se trouve une méthionine dont la mutation en valine dans les ATPase-Cu⁺ humaines conduit à une perte de l'activité (Voskoboinik *et coll.*, 2001b; Voskoboinik *et coll.*, 2001a).

Fait du hasard ou de la nécessité, un acide aspartique est conservé dans le 6^{ème} segment transmembranaire de la plupart des ATPases-Ca²⁺, Na⁺/K⁺ et H⁺. Cet acide aminé est impliqué dans les sites de transport de ces ATPases. Du point de vue

topologique, ce segment est équivalent au 8^{ème} segment transmembranaire des ATPases de type P_i.

En plus des mutations simples, deux double-mutants, **ΔMBD-P355A** et **E164A-P355A** ont été réalisés et soumis au test phénotypique. **ΔMBD**, un mutant correspondant à la troncature du domaine N-terminal de liaison des métaux, est un mutant de *type II*. C'est aussi le cas des mutants **E164A** et **P355A**. Le double mutant **ΔMBD-P355A** induit un phénotype intermédiaire (*type II*), les levures poussant jusqu'à 1 μM de cadmium, comme les mutants **ΔMBD** et **P355A** pris séparément alors que le double mutant **E164A-P355A** induit un phénotype de *type III*, ce qui suggère que la protéine n'est pas fonctionnelle. Nous constatons donc une additivité de l'effet des mutations transmembranaire, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle **E164** et **P355** seraient impliqués dans la voie de passage du métal au sein de **CadA_{LM}**. Les doubles mutants **ΔMBD-P355A** et **E164A-P355A** ne sont pas encore caractérisés du point de vue fonctionnel.

Comme le montrent les expériences de phosphorylation par l'ATP et le P_i sur les mutants de **CadA_{LM}**, les résultats issus de l'analyse fonctionnelle s'avèrent plus compliqués à interpréter que ceux venant du test phénotypique. De plus, dans certains cas, nous avons obtenus des résultats par analyse biochimique *in vitro* qui ne sont pas en accord avec les résultats obtenus dans la levure, soit *in vivo*. Par exemple, le mutant **P355A** a un phénotype de *type II*, c'est-à-dire que la protéine est active au niveau de transport de Cd²⁺, mais moins toxique que **CadA_{LM}** sauvage. Cependant, **P355A** n'est pas phosphorylée après 15 s en présence d'ATP, ce qui suggère que le cycle est peut-être simplement ralenti par la mutation et devra être vérifié.

Le mutant **C356A** a un phénotype de *type III*, c'est-à-dire d'une protéine inactive, mais l'analyse biochimique montre que **C356A** n'est pas très différente de **CadA_{LM}** sauvage. De plus, le dérivé phosphorylé formé par l'ATP se déphosphoryle spontanément au cours du temps (Figure D1A) et est sensible à la dilution isotopique (Figure D1B), ce qui suggère que **C356A** est une protéine active. Pour concilier ces

résultats, on peut supposer que la mutation induit un découplage entre consommation d'ATP et transport de Cd^{2+} .

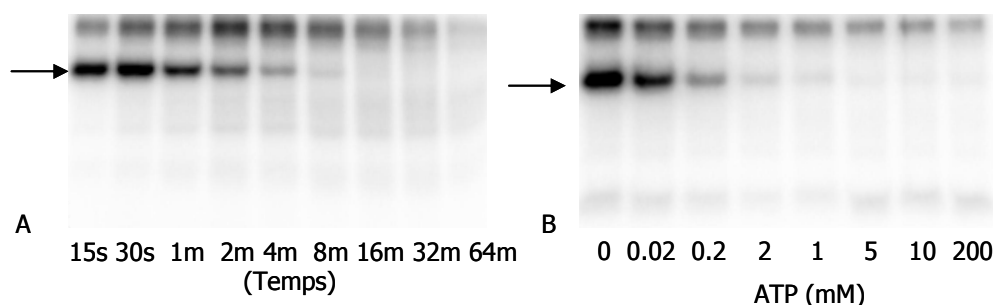


Figure D1 **A**, La déphosphorylation de **C356A** en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 1 μM , Cd^{2+} 500 et Mg^{2+} 1 mM en fonction de temps. **B**, La déphosphorylation de **C356A** induite après 15 s de phosphorylation en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 1 μM , Cd^{2+} 500 et Mg^{2+} 1 mM par dilution isotopique à la concentration d'ATP non radioactif indiquée pendant 15 s.

Dans les travaux précédents sur SERCA1a, il y a au moins un exemple où l'analyse biochimique a montré ses limites. L'aspartate 908 de SERCA1a qui faisait partie de la liste des acides aminés susceptibles de participer aux sites de transport (Clarke *et coll.*, 1989), en a été supprimé après une analyse biochimique (Andersen et Vilsen, 1998), jusqu'à ce que la résolution à 2,6 Å de la structure de SERCA1a en présence de Ca^{2+} (Toyoshima *et coll.*, 2000) prouve définitivement son appartenance aux sites Ca^{2+} . Il est clair que les conditions physiologiques dans lesquelles travaille **CadA_{LM}** (*in vivo*) sont différentes des conditions expérimentales utilisées *in vitro*, et il n'est pas surprenant que certains résultats soient contradictoires. Malgré tout cela, on peut raisonnablement supposer d'après les tests phénotypiques des implications des acides aminés M149, E164, C354, P355, C356, T684 et D692 au site de transport de **CadA_{LM}**, car ces mutations sont dans le domaine transmembranaire, la localisation des mutants dans la levure est la même que celle de **CadA_{LM}** sauvage et l'accessibilité du site catalytique de ces mutants est identique à celle de **CadA_{LM}**, selon la protéolyse ménagée.

Enfin, nos travaux sur l'interaction entre domaines en utilisant des protéines chimères donnent des résultats intéressants, mais encore préliminaires. Ils montrent

que la sélectivité des ATPases de type P ne se trouve pas au niveau du site catalytique et que le site nucléotidique est essentiel pour l'activité de **CadA_{LM}**. Ils suggèrent aussi l'importance d'interactions spécifiques entre le site nucléotidique et le reste de la protéine **CadA_{LM}**. Ces interactions seraient rompues par le remplacement du site nucléotidique de **CadA_{LM}** par celui d'une autre ATPase de type P, mais pourraient être compensées par le site de phosphorylation venant de la même ATPase de type P_I. Néanmoins, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour préciser quel domaine de **CadA_{LM}** participe à ces interactions spécifiques avec le site nucléotidique et comment se produit la compensation par le site de phosphorylation.

Références

-A-

- Ahlers, J., Ahr, E. and Seyfarth, A. (1978) "Kinetic characterization of plasma membrane ATPase from *Saccharomyces cerevisiae*" *Mol. Cell. Biochem.* **22**, 39-49.
- Altendorf, K., Gassel, M., Puppe, W., Mollenkamp, T., Zeeck, A., Boddien, C., Fendler, K., Bamberg, E. and Drose, S. (1998) "Structure and function of the Kdp-ATPase of *Escherichia coli*" *Acta Physiol. Scand. Suppl* **643**, 137-146.
- Andersen, J. and Vilsen, B. (1998) "Structure-function relationships of the calcium binding sites of the sarcoplasmic reticulum $\text{Ca}(2+)\text{-ATPase}$." *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **643**, 45-54.
- Andersen, J. P., Jorgensen, P. L. and Møller, J. V. (1985) "Direct demonstration of structural changes in soluble, monomeric $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ associated with Ca^{2+} release during the transport cycle" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4573-4577.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Molteni, E., Huffman, D. L. and O'Halloran, T. V. (2002) "Metallochaperones and metal-transporting ATPases: a comparative analysis of sequences and structures" *Genome Res.* **12**, 255-271.
- Auland, M. E., Roufogalis, B. D., Devaux, P. F. and Zachowski, A. (1994) "Reconstitution of ATP-dependent aminophospholipid translocation in proteoliposomes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10938-10942.
- Axelsen, K. B. and Palmgren, M. G. (1998) "Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily" *J. Mol. Evol.* **46**, 84-101.

-B-

- Bal, N. (13 décembre 2002) "Etude fonctionnelle de CadA, l'ATPase-cadmium de *Listeria monocytogenes*" *thèse de l'Université Joseph Fourier, Grenoble 1*.
- Bal, N., Mintz, E., Guillain, F. and Catty, P. (2001) "A possible regulatory role for the metal-binding domain of CadA, the *Listeria monocytogenes* $\text{Cd}^{2+}\text{-ATPase}$ " *FEBS Lett.* **506**, 249-252.
- Bal, N., Wu, C. C., Catty, P., Guillain, F. and Mintz, E. (2003) " Cd^{2+} and the N-terminal metal-binding domain protect the putative membranous CPC motif of the $\text{Cd}^{2+}\text{-ATPase}$ of *Listeria monocytogenes*" *Biochem. J.* **369**, 681-685.

- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Finney, L. A., Outten, C. E. and O'Halloran, T. V. (2002) "A new zinc-protein coordination site in intracellular metal trafficking: solution structure of the Apo and Zn(II) forms of ZntA(46-118)" *J. Mol. Biol.* **323**, 883-997.
- Bissig, K. D., Wunderli-Ye, H., Duda, P. W. and Solioz, M. (2001) "Structure-function analysis of purified *Enterococcus hirae* CopB copper ATPase: effect of Menkes/Wilson disease mutation homologues" *Biochem. J.* **357**, 217-223.
- Borreman, B., Hobman, J. L., Provoost, A., Brown, N. L. and van Der Lelie, D. (2001) "Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34" *J. Bacteriol.* **183**, 5651-5658.
- Bull, P. C., Thomas, G. R., Rommens, J. M., Forbes, J. R. and Cox, D. W. (1993) "The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene" *Nat. Genet.* **5**, 327-337.

-C-

- Camakaris, J., Voskoboinik, I. and Mercer, J. F. (1999) "Molecular mechanisms of copper homeostasis" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 225-232.
- Catty, P., de Kerchove d'Exaerde, A. and Goffeau, A. (1997) "The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases" *FEBS Lett.* **409**, 325-332.
- Centeno, F., Deschamps, S., Lompre, A. M., Anger, M., Moutin, M. J., Dupont, Y., Palmgren, M. G., Villalba, J. M., Møller, J. V., Falson, P. and et al. (1994) "Expression of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in yeast" *FEBS Lett.* **354**, 117-122.
- Chen, C. Y., Ingram, M. F., Rosal, P. H. and Graham, T. R. (1999) "Role for Drs2p, a P-type ATPase and potential aminophospholipid translocase, in yeast late Golgi function" *J. Cell. Biol.* **147**, 1223-1236.
- Clarke, D. M., Loo, T. W., Inesi, G. and MacLennan, D. H. (1989) "Location of high affinity Ca²⁺-binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase" *Nature* **339**, 476-478.
- Clarke, D. M., Loo, T. W., Inesi, G. and MacLennan, D. H. (1989) "Location of high affinity Ca²⁺-binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase" *Nature* **339**, 476-478.

Clarke, D. M., Loo, T. W., and MacLennan, D. H. (1990) "Functional consequences of alterations to polar aminoacids located in the transmembrane domain of the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **265**, 6262-6267

-D-

de Kerchove d'Exaerde, A., Supply, P., Dufour, J. P., Bogaerts, P., Thines, D., Goffeau, A. and Boutry, M. (1995) "Functional complementation of a null mutation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H(+)-ATPase by a plant H(+)-ATPase gene" *J. Biol. Chem.* **270**, 23828-23837.

de Meis, L. and Vianna, A. L. (1979) "Energy interconversion by the Ca²⁺-dependent ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum" *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 275-292.

Degand, I., Catty, P., Talla, E., Thines-Sempoux, D., de Kerchove d'Exaerde, A., Goffeau, A. and Ghislain, M. (1999) "Rabbit sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase replaces yeast PMC1 and PMR1 Ca(2+)-ATPases for cell viability and calcineurin-dependent regulation of calcium tolerance" *Mol. Microbiol.* **31**, 545-556.

Dix, D. R., Bridgham, J. T., Broderius, M. A., Byersdorfer, C. A. and Eide, D. J. (1994) "The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Biol. Chem.* **269**, 26092-26099.

Dupont, Y. (1976) " Fluorescence studies of the sarcoplasmic reticulum calcium pump" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **71**, 544-550.

Dupont, Y. (1982) " Low-temperature studies of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. Mechanism of calcium binding" *Biochim. Biophys. Acta* **688**, 75-87

Dupont, Y., Guillaín, F. and Lacapère, J. J. (1988) " Fluorimetric Detection and Significance of Conformational Changes in Ca²⁺-ATPase" in *Methods in Enzymology* **157**, pp 206-219, (Fleischer, S. and Fleischer, B., ed.), Academic Press, New York.

Dux, L. and Martonosi, A. (1983) "Two-dimensional arrays of proteins in sarcoplasmic reticulum and purified Ca²⁺-ATPase vesicles treated with vanadate" *J. Biol. Chem.* **258**, 2599-2603.

-E-

Ebashi, S. (1961) "Calcium binding activity of vesicular relaxing factor" *J. Biochem.* **50**, 236-244

Eide, D. J. (2001) "Functional genomics and metal metabolism" *Genome Biol* **2**, reviews1028.1-reviews1028.3.

Engelhardt, W.A. and Ljubimowa, M.N. (1939) "Myosin and Adenosine triphosphatase" *Nature*, **144**, 668-669

-F-

Fagan, M. J. and Saier, M. H., Jr. (1994) "P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence analyses and construction of phylogenetic trees" *J. Mol. Evol.* **38**, 57-99.

Forbes, J. R. and Cox, D. W. (1998) "Functional characterization of missense mutations in *ATP7B*: Wilson disease mutation or normal variant?" *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 1663-1674.

Forge, V., Mintz, E. and Guillain, F. (1993) " Ca^{2+} binding to Sarcoplasmic Reticulum ATPase Revisited. I. mechanism of affinity and cooperativity modulation by H^+ and Mg^{2+} " *J. Biol. Chem.* **268**, 10953-10960.

-G-

Gerencser, G. A. and Zhang, J. (2003) "Existence and nature of the chloride pump" *Biochim. Biophys. Acta* **1618**, 133-139.

Gietz, R. D. and Sugino, A. (1988) "New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites" *Gene* **74**, 527-534.

Glynn, I.M. (1978) "Overview: the coupling of enzymatic steps to the translocation of sodium and potassium." *Prog. Clin. Biol. Res.* **268 A**, 435-460.

Gomes, E., Jakobsen, M. K., Axelsen, K. B., Geisler, M. and Palmgren, M. G. (2000) "Chilling tolerance in *Arabidopsis* involves ALA1, a member of a new family of putative aminophospholipid translocases" *Plant Cell* **12**, 2441-2454.

Gravot, A., Lieutaud, A., Verret, F., Auroy, P., Vavasseur, A. and Richaud, P. (2004) "AtHMA3, a plant P1B-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast" *FEBS Lett* **561**, 22-28.

-H-

Halleck, M. S., Pradhan, D., Blackman, C., Berkes, C., Williamson, P. and Schlegel, R. A. (1998) "Multiple members of a third subfamily of P-type ATPases identified by genomic sequences and ESTs" *Genome Res.* **8**, 354-361.

Hasselbach, W. and Makinose, M. (1961) "The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle and its dependence on ATP-splitting" *Biochem. Z* **333**, 518-528.

Hasselbach, W. and Makinose, M. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **7**, 132-136

Hou, Z. and Mitra, B. (2003) "The metal specificity and selectivity of ZntA from *Escherichia coli* using the acylphosphate intermediate" *J. Biol. Chem.* **278**, 28455-28461.

Hung, I. H., Suzuki, M., Yamaguchi, Y., Yuan, D. S., Klausner, R. D. and Gitlin, J. D. (1997) "Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Biol. Chem.* **272**, 21461-21466.

-I-

Iida, M., Terada, K., Sambongi, Y., Wakabayashi, T., Miura, N., Koyama, K., Futai, M. and Sugiyama, T. (1998) "Analysis of functional domains of Wilson disease protein (ATP7B) in *Saccharomyces cerevisiae*" *Febs Lett.* **428**, 281-285.

Imamura, Y., Saito, K. and Kawakita, M. (1984) "Conformational change of Ca^{2+} , Mg^{2+} -adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum upon binding of Ca^{2+} and adenylyl-5'-yl-imidodiphosphate as detected by trypsin sensitivity analysis" *J. Biochem. (Tokyo)* **95**, 1305-1313.

-J-

Jencks, W. P. (1989) "How Does a Calcium Pump Pump Calcium?" *J. Biol. Chem.* **264**, 18855-18858.

-K-

Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (1996) "Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions" *DNA Res.* **3**, 109-136.

- Klein, M., Mamnun, Y. M., Eggmann, T., Schuller, C., Wolfger, H., Martinoia, E. and Kuchler, K. (2002) "The ATP-binding cassette (ABC) transporter Bpt1p mediates vacuolar sequestration of glutathione conjugates in yeast" *FEBS Lett.* **520**, 63-67.
- Knowles, A. F. and Racker, E. (1975) "Formation of Adenosine Triphosphate from Pi and Adenosine Diphosphate by Purified Ca^{2+} -Adenosine Triphosphatase" *J. Biol. Chem.* **250**, 1949-1951.
- Krishna, S., Cowan, G., Meade, J. C., Wells, R. A., Stringer, J. R. and Robson, K. J. (1993) "A family of cation ATPase-like molecules from *Plasmodium falciparum*" *J. Cell. Biol.* **120**, 385-398.
- Kuhlbrandt, W., Zeelen, J. and Dietrich, J. (2002) "Structure, mechanism, and regulation of the *Neurospora* plasma membrane H^{+} -ATPase" *Science* **297**, 1692-1696.

-L-

- Lacapère, J. J., Bennett, N., Dupont, Y. and Guillain, F. (1990) "pH and Magnesium Dependence of ATP Binding to Sarcoplasmic Reticulum ATPase" *J. Biol. Chem.* **265**, 348-353.
- Lacapère, J. J., Gingold, M. P., Champeil, P. and Guillain, F. (1981) "Sarcoplasmic Reticulum ATPase Phosphorylation from Inorganic Phosphate in the Absence of a Calcium Gradient" *J. Biol. Chem.* **256**, 2302-2306.
- Lebrun, M., Audurier, A. and Cossart, P. (1994a) "Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are present on Tn5422, a novel transposon closely related to Tn917" *J. Bacteriol.* **176**, 3049-3061.
- Lebrun, M., Audurier, A. and Cossart, P. (1994b) "Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to *cadA* and *cadC* of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium" *J. Bacteriol.* **176**, 3040-3048.
- Lebrun, M., Loulergue, J., Chaslus-Dancla, E. and Audurier, A. (1992) "Plasmids in *Listeria monocytogenes* in relation to cadmium resistance" *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3183-3186.
- Lenoir, G., Menguy, T., Corre, F., Montigny, C., Pedersen, P. A., Thines, D., le Maire, M. and Falson, P. (2002) "Overproduction in yeast and rapid and efficient purification of the rabbit SERCA1a Ca^{2+} -ATPase" *Biochim. Biophys. Acta* **1560**, 67-83.

- Liu, X. F., Supek, F., Nelson, N. and Culotta, V. C. (1997) "Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene" *J. Biol. Chem.* **272**, 11763-11769.
- Lowe, J., Vieyra, A., Catty, P., Guillain, F., Mintz, E. and Cuillel, M. (2004) "A mutational study in the transmembrane domain of Ccc2p, the yeast Cu(I)-ATPase, shows different roles for each Cys-Pro-Cys cysteine" *J. Biol. Chem.* **279**, 25986-25994.
- Lutsenko, S. and Kaplan, J. H. (1995) "Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity" *Biochemistry* **34**, 15607-15613.
- M-**
- Mahanty, S. K., Rao, U. S., Nicholas, R. A. and Scarborough, G. A. (1994) "High yield expression of the *Neurospora crassa* plasma membrane H(+)-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Biol. Chem.* **269**, 17705-17712.
- Makinose (1973) "Possible functional states of the enzyme of the sarcoplasmic reticulum" *FEBS Lett.* **37**, 140-143
- Makinose and Hasselbach (1971) *FEBS Lett.*, **121**, 271-272
- Mandal, A. K., Cheung, W. D. and Arguello, J. M. (2002) "Characterization of a thermophilic P-type Ag⁺/Cu⁺-ATPase from the extremophile *Archaeoglobus fulgidus*" *J. Biol. Chem.* **277**, 7201-7208.
- McIntosh, D. B., Clausen, J. D., Woolley, D. G., MacLennan, D. H., Vilsen, B. and Andersen, J. P. (2004) "Roles of conserved P domain residues and Mg²⁺ in ATP binding in the ground and Ca²⁺-activated states of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase" *J. Biol. Chem.* **279**, 32515-32523.
- Menkes, J. H., Alter, M., Steigleder, G. K., Weakley, D. R. and Sung, J. H. (1962) "A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration" *Pediatrics* **29**, 764-779.
- Mercer, J. F. (2001) "The molecular basis of copper-transport diseases" *Trends Mol. Med.* **7**, 64-69.
- Mintz, E., Lacapère, J. J. and Guillain, F. (1990) "Reversal of the Sarcoplasmic Reticulum ATPase Cycle by Substituting Various Cations for Magnesium" *J. Biol. Chem.* **265**, 18762-18768.

- Mitra, B. and Sharma, R. (2001) "The cysteine-rich amino-terminal domain of ZntA, a Pb(II)/Zn(II)/Cd(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*, is not essential for its function" *Biochemistry* **40**, 7694-7699.
- Møller, J. V., Juul, B. and le Maire, M. (1996) "Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases." *Biochim. Biophys. Acta* **1286**, 1-51.
- Moncrief, M. B. and Maguire, M. E. (1999) "Magnesium transport in prokaryotes" *J. Biol. Inorg. Chem.* **4**, 523-527.
- Morsomme, P., de Kerchove d'Exaerde, A., De Meester, S., Thines, D., Goffeau, A. and Boutry, M. (1996) "Single point mutations in various domains of a plant plasma membrane H(+)-ATPase expressed in *Saccharomyces cerevisiae* increase H(+)-pumping and permit yeast growth at low pH" *Embo J.* **15**, 5513-5526.
- Mouro, I., Halleck, M. S., Schlegel, R. A., Mattei, M. G., Williamson, P., Zachowski, A., Devaux, P., Cartron, J. P. and Colin, Y. (1999) "Cloning, expression, and chromosomal mapping of a human ATPase II gene, member of the third subfamily of P-type ATPases and orthologous to the presumed bovine and murine aminophospholipid translocase" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 333-339.

-N-

- Nelson, N. (1999) "Metal ion transporters and homeostasis" *Embo J.* **18**, 4361-4371.
- Nies, D. H. (1999) "Microbial heavy-metal resistance" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 730-750.
- Nies, D. H. (2003) "Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes" *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 313-339.

-O-

- Oger, C., Berthe, T., Quillet, L., Barray, S., Chiffolleau, J. F. and Petit, F. (2001) "Estimation of the abundance of the cadmium resistance gene *cadA* in microbial communities in polluted estuary water" *Res. Microbiol.* **152**, 671-678.
- Okamura, H., Denawa, M., Ohniwa, R. and Takeyasu, K. (2003) "P-type ATPase superfamily: evidence for critical roles for kingdom evolution" *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **986**, 219-223.

-P-

- Palmgren, M. G. and Axelsen, K. B. (1998) "Evolution of P-type ATPases" *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 37-45.
- Palmgren, M. G. and Christensen, G. (1994) "Functional comparisons between plant plasma membrane H(+)-ATPase isoforms expressed in yeast" *J. Biol. Chem.* **269**, 3027-3033.
- Payne, A. S. and Gitlin, J. D. (1998) "Functional expression of the Menkes disease protein reveals common biochemical mechanisms among the copper-transporting P-type ATPases" *J. Biol. Chem.* **273**, 3765-3770.
- Pedersen, P. A., Jorgensen, J. R. and Jorgensen, P. L. (2000) "Importance of conserved alpha-subunit segment 709GDGVND for Mg²⁺ binding, phosphorylation, and energy transduction in Na,K-ATPase" *J. Biol. Chem.* **275**, 37588-37595.
- Pedersen, P. L. and Carafoli, E. (1987) "Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function" *Trends Biochem. Sci.* **12**, 146-150.
- Perry, R. D. and Silver, S. (1982) "Cadmium and manganese transport in *Staphylococcus aureus* membrane vesicles" *J. Bacteriol.* **150**, 973-976.

-R-

- Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C. and O'Halloran, T. V. (1999) "Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase" *Science* **284**, 805-808.
- Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B. and Rosen, B. P. (2000) "CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 652-656.
- Rensing, C., Ghosh, M. and Rosen, B. P. (1999) "Families of soft-metal-ion-transporting ATPases" *J. Bacteriol.* **181**, 5891-5897.

-S-

- Saito, K., Imamura, Y. and Kawakita, M. (1984) "Effect of temperature and added ligands on the susceptibility of Ca²⁺,Mg²⁺-adenosine triphosphatase of the sarcoplasmic reticulum to trypsin" *J. Biochem. (Tokyo)* **95**, 1297-1304.
- Scarborough, G. A. (1999) "Structure and function of the P-type ATPases" *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 517-522.

- Sharma, R., Rensing, C., Rosen, B. P. and Mitra, B. (2000) "The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*" *J. Biol. Chem.* **275**, 3873-3878.
- Shigekawa, M. and Dougherty, J. P. (1978) "Reaction mechanism of Ca^{2+} -dependent ATP hydrolysis by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum in the absence of added alkali metal salts. III. Sequential occurrence of ADP-sensitive and ADP-insensitive phosphoenzymes" *J. Biol. Chem.* **253**, 1458-1464.
- Shiraishi, E., Inouhe, M., Joho, M. and Tohoyama, H. (2000) "The cadmium-resistant gene, CAD2, which is a mutated putative copper-transporter gene (PCA1), controls the intracellular cadmium-level in the yeast *S. cerevisiae*" *Curr. Genet.* **37**, 79-86.
- Shull, G. E. (2000) "Gene knockout studies of Ca^{2+} -transporting ATPases" *Eur. J. Biochem.* **267**, 5284-5290.
- Sikorski, R. S. and Hieter, P. (1989) "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*" *Genetics* **122**, 19-27.
- Skou, J.C., (1960) *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 6
- Skou, J. C. (1974) "Effect of ATP on the intermediary steps of the reaction of the $(\text{Na}^{+}+\text{K}^{+})$ -dependent enzyme system. I. Studied by the use of *N*-ethylmaleimide inhibition as a tool" *Biochim. Biophys. Acta* **339**, 234-245.
- Solioz, M. and Vulpe, C. (1996) "CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals" *Trends Biochem. Sci.* **21**, 237-241.
- Sorensen, T. L., Møller, J. V. and Nissen, P. (2004) "Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump" *Science* **304**, 1672-1675.
- Supek, F., Supekova, L., Nelson, H. and Nelson, N. (1996) "A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5105-5110.
- Supek, F., Supekova, L., Nelson, H. and Nelson, N. (1997) "Function of metal-ion homeostasis in the cell division cycle, mitochondrial protein processing, sensitivity to mycobacterial infection and brain function" *J. Exp. Biol.* **200**, 321-330.
- Supply, P., Wach, A. and Goffeau, A. (1993) "Enzymatic properties of the PMA2 plasma membrane-bound $\text{H}(+)$ -ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Biol. Chem.* **268**, 19753-19759.

Szczypka, M. S., Wemmie, J. A., Moye-Rowley, W. S. and Thiele, D. J. (1994) "A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein" *J. Biol. Chem.* **269**, 22853-22857.

-T-

Tang, X., Halleck, M. S., Schlegel, R. A. and Williamson, P. (1996) "A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity" *Science* **272**, 1495-1497.

Toyoshima, C. and Mizutani, T. (2004) "Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue" *Nature* **430**, 529-535.

Toyoshima, C. and Nomura, H. (2002) "Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium" *Nature* **418**, 605-611.

Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. and Ogawa, H. (2000) "Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution" *Nature* **405**, 647-655.

Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. and Ogawa, H. (2000) "Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution" *Nature* **405**, 647-655.

Toyoshima, C., Nomura, H. and Tsuda, T. (2004) "Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues" *Nature* (sous presse).

Tsivkovskii, R., MacArthur, B. C. and Lutsenko, S. (2001) "The Lys1010-Lys1325 fragment of the Wilson's disease protein binds nucleotides and interacts with the N-terminal domain of this protein in a copper-dependent manner" *J. Biol. Chem.* **276**, 2234-2242.

Tsivkovskii, R., MacArthur, B. C. and Lutsenko, S. (2001) "The Lys1010-Lys1325 fragment of the Wilson's disease protein binds nucleotides and interacts with the N-terminal domain of this protein in a copper-dependent manner" *J. Biol. Chem.* **276**, 2234-2242.

-V-

Vianna, A. L. (1975) "Interaction of calcium and magnesium in activating and inhibiting the nucleoside triphosphatase of Sarcoplasmic Reticulum vesicles" *Biochim. Biophys. Acta* **410**, 389-406.

- Villalba, J. M., Palmgren, M. G., Berberian, G. E., Ferguson, C. and Serrano, R. (1992) "Functional expression of plant plasma membrane H(+)-ATPase in yeast endoplasmic reticulum" *J. Biol. Chem.* **267**, 12341-12349.
- Vilsen, B., Andersen, J., Clarke, D. and MacLennan, D. (1989) "Functional consequences of proline mutations in the cytoplasmic and transmembrane sectors of the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum." *J. Biol. Chem.* **264**, 21024-21030.
- Voskoboinik, I., Greenough, M., La Fontaine, S., Mercer, J. F. and Camakaris, J. (2001a) "Functional studies on the Wilson copper P-type ATPase and toxic milk mouse mutant" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 966-970.
- Voskoboinik, I., Mar, J., Strausak, D. and Camakaris, J. (2001b) "The regulation of catalytic activity of the Menkes copper-translocating P-type ATPase. Role of high affinity copper-binding sites" *J. Biol. Chem.* **276**, 28620-28627.
- Vulpe, C., Levinson, B., Whitney, S., Packman, S. and Gitschier, J. (1993) "Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase" *Nat. Genet.* **3**, 7-13.

-W-

- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C. and Philippsen, P. (1997) "Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*" *Yeast* **13**, 1065-1075.
- Weber, K. and Osborn, M. (1969) "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis" *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.

-Y-

- Yamada, S. and Ikemoto, N. (1980) "Reaction Mechanism of Calcium-ATPase of Sarcoplasmic Reticulum" *J. Biol. Chem.* **255**, 3108-3119.
- Yoshimizu, T., Omote, H., Wakabayashi, T., Sambongi, Y. and Futai, M. (1998) "Essential Cys-Pro-Cys motif of *Caenorhabditis elegans* copper transport ATPase" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1258-1260.

RESUME

Les ATPases de type P1 assurent le transport d'ions métalliques lourds tels que le Cu^+ , le Cd^{2+} ou le Zn^{2+} à travers une membrane. Ce transport, qualifié d'actif parce qu'il s'exerce en sens inverse du gradient électrochimique de l'ion transporté, utilise l'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP. Une étude accomplie en 1992 indique que 36% des *Listeria monocytogenes* sont résistantes à de hautes concentrations de Cd^{2+} . Cette résistance est associée à la présence de plasmides, parmi lesquels pLm74 qui présente une séquence de 2136 paires de bases codant pour un polypeptide de 711 acides aminés nommé CadA. Ce polypeptide possède les 3 séquences signatures des ATPases de type P, les motifs DKTGT, MxTGD et TGDGxNDxP et les 2 séquences signatures des ATPases de type P1, les motifs CXXC et CPC. L'objectif de cette thèse était la recherche des acides aminés constituant la voie de passage du Cd^{2+} au sein du domaine transmembranaire de CadA. Ce travail a nécessité l'expression de CadA dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* et la caractérisation du phénotype de sensibilité au Cd^{2+} induit par la présence de CadA. Il a aussi nécessité une étude enzymatique de CadA au cours de laquelle nous avons montré que le Cd-ATP pouvait remplacer le Mg-ATP dans le cycle enzymatique de la protéine. Quatre hélices transmembranaires (3, 4, 6 et 8) constitueraient la voie de passage du Cd^{2+} dans CadA. Au sein de ces hélices, les acides aminés M149, C354 et T684 pourraient faire partie du site de liaison tandis que E164 et C356 pourraient être importants dans le processus de dissociation du métal. P355 et D692 seraient nécessaires à la phosphorylation de l'enzyme.

L'étude des domaines cytoplasmiques N (liaison des nucléotides) et P (phosphorylation) de CadA a été aussi abordée au cours de cette thèse. La caractérisation fonctionnelle d'ATPases chimériques a mis en évidence la possibilité d'échanger le domaine de phosphorylation entre différentes ATPases de type P.

TITLE: Identification and characterization of the Cd^{2+} transport sites of CadA, the Cd^{2+} -ATPase from *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT:

P1-type ATPases transport heavy metals across the membrane against their electrochemical gradient using the hydrolysis of ATP as energy source. In 1992, a study reported that 36% of *Listeria monocytogenes* were resistant to high Cd^{2+} concentrations. This resistance was associated to the presence of plasmids, among which pLm74 presents an open reading frame coding for a polypeptide of 711 amino acids, named CadA. This polypeptide possesses 3 consensus sequences of P-type ATPases, the DKTGT, MXTGD and TGDGXNDXP motifs, as well as 2 consensus sequences of P1-type ATPases, the CXXC and CPC motifs. In the present work we expressed CadA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and used the phenotype of sensitivity to cadmium induced by CadA as a screening tool for mutants produced by site-directed mutagenesis. We also demonstrated that CadA can use Cd-ATP instead of Mg-ATP as ATP substrate to accomplish its enzymatic cycle. Four transmembrane helices (3, 4, 6 and 8) might constitute the Cd^{2+} transport site of CadA. Among them M149, C354 and T684 might participate in transport sites whereas E164 and C356 could be important in the dissociation process of cadmium. P355 and D692 could be necessary for the phosphorylation. Finally, the study of chimeric ATPases suggests a regulatory role of the ATP binding domain.

DISCIPLINE: Biologie Cellulaire et Moléculaire

MOTS CLES: CadA, ATPase de type P1, cadmium, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*, site de transport

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE D'ACCUEIL :

Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, DRDC/BMC/CEA-Grenoble
17, rue des martyrs 38054 Grenoble Cedex 9